

Aus dem Departement für Nutztiere, Klinik für Reproduktionsmedizin der Vetsuisse-Fakultät
Universität Zürich

(Klinikdirektor: Prof. Dr. Heiner Bollwein)

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von Dr. Jasmin Walter

**Unterschiede im Equinen Kumulusproteom zwischen *in-vivo* und *in-vitro* maturierten
Kumuluszellen**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Fabian Josef Huwiler

Tierarzt

von Cham, Zug und Dietwil, Aargau

genehmigt im Auftrag von

Prof. Dr. Ulrich Bleul, Referent

Prof. Dr. Hanspeter Nägeli, Korreferent

Zürich, 2018

meinen Eltern

Aus dem Departement für Nutztiere, Klinik für Reproduktionsmedizin der Vetsuisse-Fakultät
Universität Zürich

(Klinikdirektor: Prof. Dr. Heiner Bollwein)

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von Dr. Jasmin Walter

**Unterschiede im Equinen Kumulusproteom zwischen *in-vivo* und *in-vitro* maturierten
Kumuluszellen**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Fabian Josef Huwiler

Tierarzt

von Cham, Zug und Dietwil, Aargau

genehmigt im Auftrag von

Prof. Dr. Ulrich Bleul, Referent

Prof. Dr. Hanspeter Nägeli, Korreferent

Zürich, 2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Verwendete Abkürzungen.....	6
1. ZUSAMMENFASSUNG.....	8
2. SUMMARY	10
3. EINLEITUNG	11
4. LITERATURÜBERSICHT.....	12
4.1. Entwicklung von Follikel und Eizellen	12
4.1.1. Oogenese	12
4.1.2. Meiose	15
4.2. Metabolismus des Kumulus-Oozyten-Komplex während der Maturation.....	17
4.3. Limitationen bei der Maturation von Eizellen <i>in-vitro</i>	19
4.4. „Omics“ Untersuchungen in der assistierten Reproduktion beim Pferd	22
4.4.1. Einführung in die Omics Methoden	22
4.4.2 Genomik	23
4.4.3 Transkriptomik	24
4.4.4. Metabolomik	25
4.5. Proteomik	25
4.5.1. Definition Proteom	25
4.5.1.1. Glykomik.....	26
4.5.2. Methodische Einführung in die Proteomikanalyse.....	27
4.5.3. Proteomik-Untersuchungen an Kumulus-Oozyten-Komplexen.....	29
4.5.4. Unterschiede im Kumulus-Proteom zwischen <i>in-vivo</i> und <i>in-vitro</i> maturierten Oozyten...	30
4.6. Erwartete Relevanz der Ergebnisse	31
5. MATERIAL UND METHODEN	32
5.1. <i>In-vivo</i> Gruppe.....	32
5.1.2. Vorbereitung der Stuten	33
5.1.3. Oozytengewinnung.....	34
5.1.4. Charakterisierung der <i>in-vivo</i> gereiften KOK	36
5.2. <i>In-vitro</i> Gruppe.....	38
5.2.1. <i>In-vitro</i> Maturation	39
5.2.2. Charakterisierung der <i>in-vitro</i> gereiften KOK.....	39
5.3. Messung der Proben am Functional Genomic Center	41

5.3.1. Probenvorbereitung	41
5.3.2. Massenspektrometrie	43
5.3.3. Datenanalyse	44
5.4. Zusammenarbeit mit anderen Instituten	45
5.5. Tierversuchsbewilligung	45
6. RESULTATE	46
6.1. Das Equine Kumulus Proteom	46
6.2. <i>In-vivo</i> hochregulierte Proteine	47
6.2.1. Proteine der Komplement- und Koagulationskaskade	47
6.2.2. Auswahl weiterer <i>in-vivo</i> hochregulierter Proteine	51
6.2.2.1. Fibronectin.....	51
6.2.2.2. Cystein-rich secretory protein	52
6.2.2.3. Zona pellucida sperm-binding protein receptor.....	53
6.2.2.4. Hemoglobin subunit alpha.....	54
6.2.2.5. Versican core protein.....	55
6.2.2.6. Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain	57
6.3. <i>In-vitro</i> hochregulierte Proteine	57
6.3.1. Fatty acid-binding protein	59
6.3.2. Secreted frizzled-related protein.....	60
6.3.3. Matrix metalloproteinase-19 und Hsp70-binding protein	60
6.3.4. Serpin.....	61
7. DISKUSSION	63
7.1. Das Equine Kumulusproteom.....	63
7.2. <i>In-vivo</i> hochregulierte Proteine	63
7.2.1. Komplement und Koagulationskaskade	64
7.2.3. Die Rolle der Komplementfaktoren als Bestandteil des innaten Immunsystems beim Ovulationsprozess	70
7.2.4. Fibronektin	71
7.2.5. Cysteine-rich secretory protein (CRISP).....	72
7.2.6. Zona pellucida sperm binding Protein 3 Receptor und Complement component 4 binding protein.....	73
7.2.7. Hemoglobin subunit alpha.....	74
7.2.8. Versican core Protein	75
7.2.9. Inter-alpha-trypsin inhibitor	76
7.3. <i>In-vitro</i> hochregulierte Proteine	77

7.3.1. Fatty acid-binding protein 3	77
7.3.2. Secreted frizzled-related protein 4.....	77
7.3.3. Matrix metalloproteinase-19 und Hitzeschock.....	78
7.3.4. Heatshock protein70-binding protein	79
7.3.5. Serpin B6.....	80
7.4. Schlussfolgerung	81
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	82
9. ANHANG.....	96
9.1. Produktverzeichnis	96
9.2. Medienverzeichnis.....	97
9.3. Protokoll zur Oozytengewinnung.....	98
9.4. Tabelle mit allen signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen.....	100
10. DANKSAGUNG.....	112
11. LEBENSLAUF	113

Verwendete Abkürzungen

ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AREG	Amphiregulin
ART	Assistierte Reproduktions Technik
BMP15	Bone morphogenic protein
C3	Komplement Komponente 3
CC	Kondensiertes Chromatin
CFAI	Komplement Faktor I
CO3	Komplement Faktor 3
Cp	Oozyten mit kompakten Kumuluszellen
CRISP	Cystein-rich secretory protein
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium; Kulturmedium
EGF	Epidermal growth factor
EH	Earl's/Hank's Medium; Kulturmedium
EREG	Epiregulin
Ex	Oozyten mit expandierten Kumuluszellen
FA	Fettsäuren
FABP	Fatty acid-binding protein
FAO	Oxidation von Fettsäuren
FIBA	Fibrinogen alpha
FIBB	Fibrinogen beta
FIBG	Fibrinogen gamma
FN	Fluoreszierender Nukleus
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GDF9	Growth differentiation factor 9
GV	Germinalvesikel
GVBD	Germinalvesikelbreakdown
Hg	Hämoglobin
HBA	Hemoglobin subunit alpha
HBB	Hemoglobin subunit beta
HCD	Higher-energy C-trap dissociation
hCG	Human chorionic gonadotropin
Hsp70	Hsp70 binding protein
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IGF	Immun-like growth factor
IGHG2	Immunoglobulin gamma
INIM	Innates Immunsystem
ITI	Inter-alpha-trypsin Inhibitor
ITIH	Inter-alpha-trypsin Inhibitor heavy chain
IVM	<i>In-vitro</i> Maturation
KKK	Komplement und Koagulationskaskade
KOK	Kumulus-Oozyten-Komplex
LH	Luteinisierungshormon
MMP	Matrix Metalloproteinase

MPF	Maturation promoting factor
MS	Massenspektrometrie
OS	Oxidativer Stress
PBS	Phosphat bufferd saline
PDE	Phosphodiesterase
PRR	Pattern recognition receptor
PTM	Posttranslationelle Modifikation
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SFRP4	Secreted frizzled-related protein
TCM199	Tissue culture medium 199
TLR	Toll-like receptor
Vcan	Versican core protein
ZP	Zona pellucida
ZP3R	Zona pellucida sperm-binding protein receptor

1. ZUSAMMENFASSUNG

Es besteht gegenwärtig eine grosse Nachfrage für assistierte Reproduktionstechniken (ART) beim Pferd. Die *in-vitro* Maturation von equinen Oozyten, ist ein limitierender Faktor in der *in-vitro* Produktion (IVP) von Embryonen bei der Stute. Ein bedeutendes Merkmal von *in-vivo* maturierten Oozyten ist, dass sie gegenüber *in-vitro* maturierten Oozyten eine höhere Entwicklungskompetenz haben (Hinrichs, 2010). Die Produktion von *in-vitro* maturierten Oozyten hoher Qualität, ist ein Schlüsselfaktor um die Erfolgsrate der IVP zu verbessern. Dies steht in engem Zusammenhang mit den verwendeten Kulturmedien. Eine Verbesserung der Medien, könnte einen Fortschritt in der *in-vitro* Produktion von Embryonen bedeuten. Dazu ist eine Gegenüberstellung des Proteinmusters von *in-vivo* und *in-vitro* maturierten Oozyten bzw. Kumulus-Oozyten-Komplexen (KOK) notwendig. Wegen der engen metabolischen Kommunikation zwischen den Kumuluszellen und der Oozyte eignen sich Kumuluszellen als einmalige Quelle, um den Metabolismus eines KOK zu untersuchen. In der vorliegenden Dissertation wurde das Proteom von Kumuluszellen aus Metaphase II Oozyten, von *in-vivo* und *in-vitro* maturierten KOK (n=7 pro Gruppe) verglichen. Die KOK aus der *in-vivo* Gruppe wurden aus Ovarien von rossigen Stuten gewonnen (Follikel >35mm, Uterusödem). Die Stuten wurden 30h nach der Verabreichung von 2500 I.E. von human chorionic gonadotropin (hCG) geschlachtet. Die KOKs aus der *in-vitro* Gruppe wurden aus regulär geschlachteten Stuten, welche im Diöstrus waren, gewonnen. Diese KOKs wurden während 30h in Maturationsmedium (DMEM + PMSG und hCG) inkubiert. Die Kumuluszellen von erfolgreich maturierten Oozyten aus beiden Gruppen wurden in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Analyse aufbewahrt. Die kumulusfreie Oozyte wurde auf das Vorhandensein eines Polkörperchens untersucht, um eine erfolgreiche Maturation nachzuweisen. Die Proteomanalyse wurde am Functional Genomic Center Zürich mittels Massenspektrometrie (MS) durchgeführt. Ein adaptiertes filterunterstütztes Protokoll für die Probenvorbereitung wurde für die Zelllyse und Proteinverdauung verwendet. Die Analyse wurde mittels Nano-HPLC MS/MS durchgeführt und die Progenesis QI Software für die Datenanalyse verwendet. Es konnten insgesamt 2060 quantifizierbare Proteine in den 14 Proben gefunden werden, wovon 248 Proteine (12%) zwischen den zwei Gruppen unterschiedlich stark exprimiert waren (fold change >2, p<0.05). Davon waren 104 Proteine (5%) in der *in-vivo* Gruppe und 144 Protein (7%) in der *in-vitro* Gruppe signifikant hochreguliert. Mit Hilfe einer „Enrichment“ Analyse in der „String“-Datenbank konnten in der *in-vivo* Gruppe 22 Proteine (p<0.05) der signifikant überrepräsentierten Gruppe „Komplement- und Koagulationskaskade“ zugeordnet werden. Dazu gehören Proteine des innate Immunsystems, welche eine wichtige Rolle im Ovulationsprozess spielen. Ein weiteres interessantes *in-vivo* hochreguliertes Proteine ist das Cystein-rich secretory protein (CRISP), welches zum ersten Mal in equinen Kumuluszellen gefunden wurde. Von weiterem biologischem Interesse sind das Versican core protein (Vcan), Fibronectin, Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (ITI-H), Hemoglobin und das Zona Pellucida sperm-binding protein 3 (ZP3R). Bei den *in-vitro* hochregulierten Proteinen fanden sich in der „Enrichment“ Analyse keine überrepräsentierten Proteine, welche zu einer biologisch interessanten Gruppe zugeordnet werden konnten. Eine Reihe biologisch interessanter Proteine wurden zur Diskussion in dieser Arbeit ausgewählt: fatty acid-binding protein (FABP), Hsp70-binding protein1 (Hsp70), Matrix metalloproteinase-19 (MMP), Secreted frizzled-related protein 4

(SFRP) und Serpin B6. Es sind alles Proteine, die in den Zusammenhang mit Hitzeschock und oxidativem Stress gebracht werden können. Sämtliche hochregulierten Proteine liefern Ansätze, wie Kulturmedien in der assistierten Pferdereproduktion verbessert werden könnten. Dazu sind weitere Versuche nötig, um die Dynamik der unterschiedlich exprimierten Proteine während der Maturation zu untersuchen und die Ergebnisse in das klinische ART Labor zu übertragen.

2. SUMMARY

There is currently great interest in assisted reproduction techniques (ART) in the horse, however the limiting factor is still the *in-vitro* maturation (IVM) for the *in-vitro* production (IVP) of equine embryos. A notable feature of equine oocytes is that those, which are matured *in-vivo*, have higher developmental competence than oocytes matured *in-vitro*. Because of the close metabolic communication between the cumulus cells and the oocyte, cumulus cells represent a unique source to study metabolism of equine cumulus oocyte complexes (COCs). The aim of this study was to investigate alterations in the proteome of cumulus complexes (CC) corresponding to single cell Metaphase II oocytes matured *in-vivo* and CC matured *in-vitro* (n=7 in each group). COCs matured *in-vivo* were collected from mares in oestrus (follicle >35mm, uterine oedema). These mares were slaughtered 30 hours after injection of 2500 I.U. of human chorionic gonadotropin (hCG). COCs matured *in-vitro* were collected from regular slaughtered mares in dioestrus. They were incubated in maturation medium (DMEM+PMSG and hCG) for 30h. CC were separated from their oocyte, washed in PBS, and stored in liquid nitrogen. The cumulus free oocyte was examined for extrusion of the first polar body, to assure successful maturation. Proteome analysis was conducted by a mass spectrometry (MS) based approach. An adapted filter-aided sample preparation protocol was used for cell lysis and protein digestion. MS was performed by nano-HPLC MS/MS and Progenesis QI software (Nonlinear Dynamics) was used for data analysis. Two thousand and sixty quantifiable proteins were detected in the 14 samples, of which 248 (12%) proteins were differently expressed between the groups (fold change >2, p<0.05). One hundred and four proteins (5%) were upregulated in the *in-vivo* matured MII COC and 144 (7%) in the *in-vitro* matured. Enrichment analysis using the String-Database revealed 22 proteins (p<0.05) in the *in-vivo* group which could be assigned to the significantly overexpressed metabolic pathway of the complement and coagulation cascade. Part of this metabolic pathway is made up of several proteins of the innate immunsystem, which plays an important role in the ovulatory process. Another important protein of biological interest, overexpressed in *in-vivo* matured COCs, was the cysteine rich secretory protein (CRISP), found for the first time in equine cumulus cells. Further proteins of biological interest is the Versican core protein (Vcan), Fibronectin, Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (ITI_H), Hemoglobin and the Zona pellucida sperm-binding protein 3 (ZP3R). The enrichment analysis in the *in-vitro* group showed no overrepresentation of proteins that could be assigned to biological interesting groups. Some other interesting proteins of the *in-vitro* group were chosen for the discussion: fatty acid binding protein (FABP), Hsp70-binding protein1 (Hsp70), Matrix metalloproteinase-19 (MMP), Secreted frizzled-related protein 4 (SFRP) und Serpin B6. Several proteins overexpressed in the *in-vitro* matured group are connected to heat shock or oxidative stress. This study characterizes major alterations in the cumulus proteome through the *ex-vivo* maturation process of COCs. These findings may contribute to improvements in the limited success of equine IVF. Further investigations on the dynamics of the differentially expressed proteins during the maturation procedure are necessary to corroborate these results and transfer them to the clinical ART lab.

3. EINLEITUNG

Die *in-vitro* Fertilisation (IVF) beim Pferd hat heutzutage immer noch eine sehr schlechte Erfolgsrate. Dies ist unter anderem auf die schlechte *in-vitro* Maturation der Oozyten zurückzuführen. Die Produktion und Selektion von *in-vitro* maturierten Oozyten hoher Qualität ist ein Schlüsselfaktor, um die Entwicklungskompetenz von *in-vitro* produzierten Embryos zu verbessern. Die meisten Fortschritte, welche in den letzten Jahren in der Anpassung von Kulturmedien gemacht wurden, beruhen auf empirischen Daten. Es sind grundlegende Untersuchungen nötig, um Unterschiede im Metabolismus von Kumulus-Oozyten-Komplexen (KOK) aus *in-vivo* und *in-vitro* maturierten Oozyten aufzudecken. Kumuluszellen widerspiegeln den Gesundheitszustand von Oozyten und stellen damit einen vielversprechenden Ansatz für eine nicht invasive Untersuchung der Oozytenqualität dar. Die Stute wurde als Forschungsmodell ausgewählt, weil es beim Pferd eine beträchtliche und steigende Nachfrage an der assistierten Reproduktion gibt. Wegen der ähnlichen ovariellen Physiologie kann die Stute zudem als Modell für die humane Reproduktion angesehen werden. Die Arbeitshypothese besteht darin, dass Analysen mittels „Proteomics“ ein vielversprechendes Werkzeug darstellen, um den Metabolismus von KOK's besser zu verstehen und Biomarker für eine verbesserte Vorhersage über den Maturationsgrad und die Entwicklungskompetenz von equinen Oozyten zu finden. Zusätzlich können mit diesem Wissen Kulturmedien und IVF Programme angepasst und verbessert werden. Die Selektion von Oozyten mit der höchsten Entwicklungskompetenz soll die Überproduktion von Embryonen verhindern, was aus ethischer Sicht speziell in der humanen assistierten Reproduktion von grossem Interesse ist.

4. LITERATURÜBERSICHT

4.1. Entwicklung von Follikel und Eizellen

4.1.1. Oogenese

Die Anatomie des Pferdeovars weist eine tierartliche Besonderheit auf, was das Verhältnis von Rinde und Mark betrifft. Während sich bei den anderen Haustierarten die Ovarien in eine äussere Rinden- (Zona parenchymatosa) und eine innere, gefässreiche Markzone (Zona vasculosa) gliedert, sind beim Pferd die Verhältnisse gerade umgekehrt. Die Zona vasculosa liegt aussen an der Oberfläche des Eierstocks und ist von der Serosa überzogen. Die Zona parenchymatosa, welche die Funktionsgebilde des Ovars enthält, ist im Inneren des Organs und erreicht die Ovaroberfläche nur in der sogenannten Ovulationsgrube. Nur hier finden Ovulationen statt. Während der Follikelreifung wachsen die sich vergrössernden Follikel in Richtung der Ovulationsgrube, und erreichen dabei einen Durchmesser von 4.5-6 cm. Die ovarielle Oberfläche ist mit Keimdrüsenepithel überzogen, das bei jungen Tieren noch aus kubischen Zellen besteht, später jedoch abflacht und zum serösen Überzug modifiziert (Squires et al., 1974).

Die Eizellbildung, Oogenese, vollzieht sich in der Rindenschicht des Ovars, und findet ihren Abschluss nach dem Eisprung bei der Befruchtung. Die Oogenese beschreibt die Differenzierung von diploiden Urkeimzellen, oder Primordialkeimzellen, zu haploiden Oozyten. Die Primordialkeimzellen sind bei Säugetieren zunächst extraembryonal gelegen, und zwar im Epithel des Dottersackes (Dottersackentoderm) und bereits früh durch ihre hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase von den anderen somatischen Zellen abzugrenzen. Bereits in den ersten Wochen der Embryonalentwicklung wandern die Primordialkeimzellen durch amöboide Bewegung in die Gonadenanlage ein (Schnorr, 2011). Bei der Wanderung in die Gonadenanlage und später in deren Kortex, durchlaufen die Primordialkeimzellen mehrere Mitosezyklen. Sie differenzieren dort zu mitotisch aktiven Oogonien, welche noch pränatal in die Prophase I der ersten meiotischen Teilung eintreten. Die erste Reifungsperiode umfasst das Wachstum der Oogonien zu den primären Oozyten. Dieser Prozess erfolgt bereits vor der Geburt, und wird als 1. Reifeteilung bezeichnet. Kurz nach dem Beginn der 1. Reifeteilung wird diese arretiert, und die primären Oozyten treten in eine längere Ruhephase (Diakinese) ein, die erst zu Beginn der präovulatorischen Follikelreifung beendet wird. Beim Pferd dauert dieser Prozess bis zur Geschlechtsreife, welche bei der Stute im Alter von 2-4 Jahren einsetzt. Die primären Oozyten verfallen zunächst bis zum 150. Trächtigkeitstag weitestgehend der Atresie, so dass es erst ab dem 150. Trächtigkeitstag zur Bildung von Primordialfollikeln kommt, welche von einem einschichtigen Plattenepithel umgeben sind (Deanesly, 1975). Damit ist die maximale Anzahl Oozyten im Ovar, bei der Stute zwischen dem 180. und 200. Trächtigkeitstag, schon pränatal festgelegt. In jedem Ovar macht das einen Pool von ca. 35'000 primären Oozyten aus (Driancourt, 2001). Beim Eintritt der Geschlechtsreife beginnt die Follikulogenese. Darunter wird der Prozess verstanden, indem einige Follikel den ruhenden Pool verlassen und sich über verschiedene Entwicklungsstadien bis zur Ovulationsreife bzw. bis zur Atresie entwickeln. Die Population der ovariellen Follikel kann in einen ruhenden (Primordialfollikel) und einen wachsenden (Primär-, Sekundär-, Tertiärfollikel) Follikelpool unterteilt werden (Kanitz et al., 2003). Dabei hat die Oozyte ihre endgültige Grösse von 120-130 µm erreicht (Fair, 2010). Durch Umwandlung und Teilung

der Zellen der Membrana granulosa entsteht aus dem Primordialfollikel ein Primärfollikel. Das flache Follikelepithel wird kubisch und schliesslich zylindrisch. Um die Eizelle beginnt der Aufbau der azellulären Zona pellucida als zusätzliche Glykoproteinschicht. Die Entwicklung geht weiter zum Sekundärfollikel dessen charakteristisches Kennzeichen die Vermehrung der Follikelzellen ist. Durch Gonadotropine wird eine starke mitotische Aktivität bei den Follikelzellen initiiert. Dabei setzt die Proliferation an zwei gegenüberliegenden Polen ein, so dass ein ovoider Follikel entsteht. Die Oozyte wächst in diesem Prozess annähernd zu ihrer endgültigen Größe heran und die strukturelle Differenzierung des Zytoplasmas setzt ein. Sie wird von mehreren Schichten (5-10) von Follikelzellen umgeben. Bereits in diesem Follikelstadium differenzieren die Follikelzellen zu Corona-radiata-Zellen, die die Oozyte strahlenförmig umgeben, den Basalzellen außen an der Basalmembran des Follikels und den Intermediärzellen dazwischen. Ein weiterer wichtiger Prozess bei der Entstehung eines Sekundärfollikels ist die Bildung der Zona pellucida. Sie stellt eine feinfibrilläre, glykoproteinreiche Grenzsicht mit einer Dicke zwischen 12 und 13 µm dar. Sie wird hauptsächlich von der Oozyte durch Sekretion von Proteinen im Spaltraum zwischen der Oozyte und den anliegenden Follikelzellen (perivitelliner Raum) gebildet. Aufgaben der Zona pellucida sind unter anderem die Nährstoffregulation, die Verhinderung von Polyspermie und die zu frühe Nidation des Embryos in die Gebärmutterschleimhaut. Die Follikelzellen der Corona radiata bilden Fortsätze durch die Zona pellucida aus, die über Desmosomen mit der Oozyte verbunden sind (Schnorr, 2011). Der Übergang zu einem Tertiärfollikel ist gekennzeichnet durch die Ausbildung eines flüssigkeitsgefüllten Hohlraumes, dem Antrum folliculi. Diese Entwicklung beginnt beim equinen Follikel ab einem Durchmesser von 0.3 mm (Driancourt et al., 1982). In diesem Stadium lässt sich bereits eine Erweiterung der Interzellularspalten lichtmikroskopisch erkennen. Durch ein Zusammenfliessen der Flüssigkeit bildet sich schliesslich die Follikelhöhle. Sie vergrößert sich durch ständige Sekretion von Follikelflüssigkeit (Liquor follicularis), einer hyaluronsäure- und eiweissreichen Flüssigkeit, welche hauptsächlich von den Granulosazellen sezerniert wird (Schnorr, 2011). Der Follikel nimmt erheblich an Umfang zu und die ca. 125 µm grosse Eizelle wird exzentrisch in den Eihügel, Cumulus oophorus, verlagert.

Die Follikulogenese stellt einen dynamischen Prozess dar, bei dem regelmässig eine Kohorte der ruhenden Primordialfollikel aktiviert wird und in die Wachstumsphase eintritt. Die Follikelentwicklung wechselt von einem kontinuierlichen zu einem wellenförmigen Wachstum (Fortune, 1994). Eine Follikelwelle beinhaltet das simultane Wachstum mehrerer Follikel, das bei Stuten zwei bis drei Millimeter Querschnittserweiterung des Follikels pro Tag beträgt (Gastal et al., 2004). Mit Hilfe der Ultraschalltechnik wurde es möglich, das wellenförmige Follikelwachstum von Follikeln, mit einer Mindestgrösse von zwei Millimetern bei Stuten zu beschreiben (Donadeu and Pedersen, 2008). Während eines Zykluses lassen sich bei Stuten bis zu zwei Follikelwellen beobachten (Ginther et al., 2004a). Allerdings zeigen nur 25% der Stuten eine zweite Follikelwelle, die sich während der ersten Hälfte des Diöstrus entwickelt. Sieben Tage vor der Ovulation und bei Stuten mit zwei Follikelwellen zusätzlich am Zyklustag fünf, lassen sich bei den Follikeln einer heranwachsenden Follikelkohorte unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten feststellen (Ginther et al., 2003). Während ein oder auch zwei Follikel ein Wachstum von zwei bis drei Millimeter am Tag beibehalten, verlangsamen die subordinanten Follikel ihr Wachstum und

gehen in Regression über (Ginther and Utt, 2004; Ginther et al., 2007a). Dieser Vorgang wird als Deviation bezeichnet. Der Follikel mit dem Wachstumsvorteil erwirbt während des Deviationsprozesses die Funktion zur Ausbildung der Dominanz in der Follikelkohorte. Der Ausprägung der Dominanz geht ein Prozess der Follikelselektion voraus, der bis zur Deviation der Follikel anhält. Am Selektionsprozess sind eine Vielzahl von Proteinen und Steroiden beteiligt. Dazu gehören insbesondere Östradiol, Inhibine, Aktivine, Follistatin und Proteine der IGF (immun-like growth factor) Gruppe. Sie wirken über parakrine Wege unterstützend oder inhibierend auf die Wirkung der hypophysären Gonadotropine (Fortune et al., 2004). Obwohl das Grössenwachstum von verschiedenen Follikeln zu Beginn einer Follikelwelle vergleichbar ist, kann der zukünftige dominante Follikel bereits sechs Tage vor der Deviation an einem Grössenvorteil erkannt werden (Gastal et al., 2000). Bis zur Deviation besitzen noch alle grösseren Follikel einer Wachstumswelle das Potential zur Ausprägung der Dominanz (Gastal et al., 2004; Ginther et al., 2004b). Erst nach der Deviation mit dem Ende des Selektionsprozesses geht den zweitgrößten Follikeln dieses Potential verloren. In der Regel erlangt nur ein Follikel die Dominanz über die subordinanten Follikel der Kohorte, jedoch lassen sich in bis zu 30% der Östren Doppelentwicklungen von dominanten Follikeln beobachten (Hohenhaus and Bostedt, 1992). Der dominante Follikel ist in der Lage bis zum Zyklusende auf einen Durchmesser von 35-55 mm heranzuwachsen. Im weiteren Verlauf der Follikelreifung entwickelt sich der dominante Follikel zum präovulatorischen Follikel. Dabei nimmt die Rezeptorexpression für das luteinisierende Hormon (LH) in den Theka- und Granulosazellen unter dem Einfluss der steigenden systemischen LH-Konzentration weiterhin zu. Die im Diöstrus nur moderat ansteigenden peripheren LH-Konzentrationen, die essenziell für das Wachstum des dominanten Follikels sind, zeigen zu Beginn der Rosse einen zweiten schnellen Anstieg und bleiben für etwa sieben Tage auf einem hohen Niveau. Die periphere LH-Konzentration erreicht bei Stuten einen Tag nach der Ovulation das Maximum (Ginther et al., 2007b). Die hohen LH-Konzentrationen sind verantwortlich für die Ausprägung der ovulatorischen Kompetenz des dominanten Follikels und die damit verbundene ovulationsauslösende Wirkung von LH (Donadeu and Watson, 2007). Bereits ab einem Follikeldurchmesser von 25 mm kommen die meisten dominanten Follikel durch eine Applikation des LH-Rezeptoragonisten human chorionic gonadotropin (hCG) zur Ovulation (Cuervo-Arango and Newcombe, 2008). HCG besteht aus zwei Proteinketten, welche Galactose und Hexosamine beinhalten. Es wird in den Mikrovilli des Choreons der menschlichen Plazenta gebildet, und hat die höchste Konzentration zwischen dem 35. und 50. Tag post conceptionem. Beim Mensch ist es ein essentielles Luteotropin, um die luteale Funktion zu stimulieren und aufrecht zu erhalten bis die Plazenta selber genügend ausgebildet ist, um eine Schwangerschaft zu gewährleisten. Wenn hCG Stuten im mittleren oder späten Östrus injiziert wird, kann die Ovulation und die Maturation der Oozyte beschleunigt werden. Der Östrus wird somit auch verkürzt. Unter dem Einfluss von Östrogen während der Rosse kommt es zu einer Ödematisierung des Uterus. Anhand des Ödems kann man zwischen diöstrischen, und östrischen Follikeln unterscheiden. Ab einem Follikeldurchmesser von 35 mm im Östrus gilt die Ovulation als Reaktion auf eine Applikation von 2500 IE hCG als sicher (Gastal et al., 2006). Wird einer Stute mit einem präovulatorischen Follikel mit einem Durchmesser von mehr als 32 mm der LH-Rezeptoragonist hCG in einer Dosis von 2500 IE verabreicht, finden die meisten Ovulationen in einem Zeitintervall von 30 bis 48 Stunden

nach der Injektion statt (Gastal et al., 2006). Ohne Ovulationsinduktion ist der Follikeldurchmesser zum Zeitpunkt der Ovulation bei 90% der Follikel allerdings grösser als 35 mm und erreicht Durchmesser von bis zu 55 mm. Die Follikelgrösse bei der Verabreichung von hCG ist also entscheidend. Diverse andere Studien zeigen, dass im Durchschnitt ca. 85% aller Stuten, welche eine Follikelgrösse > 35 mm aufweisen, innerhalb von 48 h ovulieren. Barbacini et al. (2000) zeigten, dass nur 76% der Stuten mit einem Follikel von 35 mm Grösse innerhalb 25-48 h nach der Verabreichung von 2000 IU hCG ovulieren. Diese Studien variieren zum Teil aufgrund der Pferderasse, welche für die Versuche ausgewählt wurde. Andere Studien zeigen deutlich, dass unter kontrollierten Bedingungen 90% der Stuten in $36\text{h} \pm 4\text{h}$ ovulieren (Barbacini et al., 2000). Es muss aber immer beachtet werden, dass die Ovulation auch vor 36 h ab der hCG Verabreichung auftreten kann. Bei Barbacini et al. (2000) haben 50% der Stuten vor den 36 h ovuliert. Um Oozyten von hCG stimulierten präovulatorischen Follikeln zu gewinnen, muss die ovarielle Aktivität mittels Ultrasonografie aufgezeichnet werden, sodass ab einer Follikelgrösse > 35 mm das hCG verabreicht werden kann. Für die Gewinnung der reifen Oocyte aus dem Follikel muss mindestens 24 h nach hCG Verabreichung gewartet werden, dass eine genügende Kumulusexpansion gewährleistet ist. Jedoch sollte man 35 h nicht überdauern, sodass es zu keiner Ovulation kommt (Hinrichs et al., 2000).

Wenn der Follikel seine Endgrösse erreicht hat, kommt es in einem umschriebenen Gebiet in der Follikelwand zur Bildung einer dünnen, anämischen, hellen Stelle. Das Stratum granulosum löst sich auf, wobei die Zellen phagozytiert oder in die Follikelflüssigkeit abgestossen werden. Der Vorgang wird durch proteolytische Enzyme der Granulosazellen beschleunigt, die gleichzeitig die Bindegewebszüge der Follikelwand angreifen. Die Ruptur an dieser Stelle (Ovulationsgrube) ist weniger die Folge weiterer intrafollikulärer Drucksteigerung, sondern in erster Linie auf die Aktivität der Enzyme und auf die lokale Ischämie zurückzuführen. Der Eisprung selbst erfolgt selten explosiv, meistens quillt die leicht visköse Flüssigkeit aus dem Follikel langsam hervor. Mit dem Flüssigkeitsstrom gelangt die Eizelle mit ihrem *Cumulus oophorus* in die freie Bauchhöhle und wird von dem durch die Zilien des Eileitertrichters erzeugten Sog erfasst und in die Tubenöffnung transportiert (Schnorr, 2011).

4.1.2. Meiose

Die Vollendung der Meiose gehört zum letzten Schritt in der Oogenese und führt dazu, dass die Oocyte maturiert wird, so dass es zu einer Befruchtung und dadurch zu einer embryonalen Entwicklung kommen kann (Thomas et al., 2004; Sirard and Coenen, 2006). Dabei wird zwischen der Kernreifung, und der Reifung des Zytoplasmas unterschieden. Modifikationen im Metabolismus einer Oocyte, die sich ändernde Organisation der Organellen im Zytoplasma und die Synthese von mRNAs, Proteinen und Transkriptionsfaktoren wird als zytoplasmatische Reifung zusammengefasst (Levesque and Sirard, 1995), während die Reduktionsteilung der Chromosomen als Kernreifung beschrieben wird (Memili et al., 2007). Die zytoplasmatische Reifung stellt den wesentlich komplexeren Prozess dar, weil die Syntheseprodukte über den gesamten Prozess der Maturation, der Fertilisation, und der Embryonalentwicklung zu bestimmten Zeitpunkten benötigt, aktiviert und verbraucht werden

(Ferreira et al., 2009). Verschiedene Studien zeigen, dass es für die volle Entwicklungskompetenz einer Oozyte eine synchrone nukleäre und zytoplasmatische Maturation braucht (Sun and Nagai, 2003; Krisher, 2004). Ungenügende zytoplasmatische Reifung kann dazu führen, dass die Umstellung vom maternalen zum embryonalen Genom nicht fehlerfrei stattfindet und als Folge ein weiteres Wachstum ausbleibt (Vassena et al., 2003). In Mäuseoozyten konnte aber auch gezeigt werden, dass es ebenfalls zu einer Entwicklungskompetenz kommen kann, wenn die zytoplasmatische Reifung und die Kernreifung unabhängig voneinander ablaufen (Eppig, 1996). Bis jetzt gibt es keine zuverlässige Methode, mit der man eine vollständige zytoplasmatische Reifung messen kann, abgesehen von einer erfolgreichen Fertilisation und Embryonalentwicklung (Krisher, 2004). Wie in Kapitel 4.1.1. schon beschrieben wird, befinden sich die Oozyten im wachsenden Follikel in der Prophase I, im Diplotän der ersten meiotischen Teilung. In diesem Stadium ist das Chromatin in kondensierter Form anzutreffen, und der Nukleus, auch als Germinalvesikel (GV) bezeichnet, beinhaltet einen oder mehrere Nucleoli (Memili et al., 2007). Unter der Stimulation von LH kommt es zur Wiederaufnahme der Meiose, was zum so genannten Germinalvesikelbreakdown (GVBD) führt (Fan and Sun, 2004). Der GVBD stellt einen entscheidenden Schritt der Meiose dar. Früher ging man davon aus, dass der LH Anstieg direkt ein Signal auf den Kumulus-Oozyten-Komplex (COC) ausübt, und so die Maturation einleitet. 2004 konnten Park et. al. zeigen, dass der LH Anstieg zuerst zur Produktion der epidermal growth factor-like (EGF) Faktoren Amphiregulin (AREG) und Epregeulin (EREG) führt (Park et al., 2004). Sie werden von den Granulosa- und Kumuluszellen gebildet und binden an EGF Rezeptoren an den Kumuluszellen und bewirken deren Expansion (Johnson et al., 1993). EGF-like Faktoren stimulieren auch die Genexpression in Kumuluszellen, was unter anderem auch die Produktion von Hyaluronsäure ermöglicht, und die Organisation der Zellen in der extrazellulären Matrix beeinflusst. Gleichzeitig wird von der Oozyte das bone morphogenic protein 15 (BMP15) und der growth differentiation factor 9 (GDF9) sekretiert (Dong et al., 1996). Diese Proteine sind wichtig für eine korrekte Differenzierung der Kumuluszellen, was wiederum essentiell für eine normale Oozytenmaturation ist (Eppig et al., 2001; Gilchrist et al., 2006). Park et al. (2004) konnten zeigen, dass das Zusammenspiel von AREG und EREG sowie die von den Oozyten sekretierten Faktoren BMP15 und GDF9 einen positiven Einfluss auf die Entwicklungskompetenz der Oozyte hat (Park et al., 2004). Die Wirkung beruht vor allem auf einem effizienten Metabolitentransfer via gap junctions von den Kumuluszellen zur Oozyte. Für die Kumulusexpansion sind die Faktoren AREG und BMP15 verantwortlich. Für die Arretierung in der Prophase I ist eine erhöhte Konzentration von cAMP in der Oozyte verantwortlich. Man ist davon ausgegangen, dass das cAMP via gap-junctions von den Kumuluszellen in die Oozyte gelangt (Gilchrist et al., 2011). Für die Aufrechterhaltung der cAMP Konzentration in der Oozyte ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPR3) verantwortlich (Mehlmann et al., 2002). Eine erhöhte Konzentration von cAMP bewirkt eine vermehrte Aktivität der Proteinkinase A, was schlussendlich die Aktivität des maturation promoting factors (MPF) erhöht. Dieser Faktor wird durch die cyclin-dependent kinase-1 (Cdk1) katalysiert und führt zum GVBD (Gilchrist et al., 2011). Auf der anderen Seite bewirkt die Wiederaufnahme der Meiose eine Erniedrigung der cAMP Aktivität in der Oozyte. Paradoxe Weise bewirkt der präovulatorische LH Anstieg eine Erhöhung der cAMP Aktivität im Follikel und in der Oozyte. Die Oozyte seinerseits reagiert darauf mit dem

starken Einsetzen der Phosphodiesterase (PDE3A), welche sehr schnell das cAMP hydrolysiert (Tsafriri et al., 1996). Die PDE3A muss während der Follikulogenese im Gleichgewicht gehalten werden, dass die Oozyte in der Prophase I arretiert bleibt. Das cGMP spielt dabei eine zentrale Rolle. Man weiss, dass cGMP, gleich wie das cAMP, in den Granulosa- und Kumuluszellen während der Arretierung in der Prophase I erhöht bleibt. Die genaue Funktion von cGMP war lange unbekannt bis Conti et al. (2006) zeigen konnten, dass cGMP via gap junctions, zwischen den Kumuluszellen und der Oozyte, direkt die Aktivität der Oozyten spezifischen PDE3A inhibiert (Conti et al., 2006; Norris et al., 2009; Vaccari et al., 2009). Es muss auch einen Mechanismus geben, der die cGMP Konzentration während der Follikulogenese aufrechterhält. Dafür ist das atriale natriuretische Peptid (ANP) verantwortlich, welches die cGMP Produktion stimuliert und die Maturation der Oozyte verhindert (Zhang et al., 2010). Die Maturation einer Oozyte ist zusammenfassend also assoziiert mit einer Erniedrigung vom cGMP, einer Aktivierung von der PDE3A und einer Erniedrigung von cAMP, was alles zusammen zur Aktivierung des MPF führt. Die MPF Aktivität beginnt im Verlauf der Meiose kurz vor dem GVBD kontinuierlich anzusteigen und erreicht eine Aktivitätsspitze bei der Metaphase I (van den Hurk and Zhao, 2005). Der MPF initiiert über verschiedene Schritte den GVBD, die Kondensation des Chromatins sowie die Organisation des Spindelapparates (Grondahl et al., 1995). Nach dem GVBD treten die Chromosomen vom Kernstadium in die Metaphase der ersten meiotischen Teilung ein. Dabei ordnen sich die gepaarten Chromosomen in der Äquatorialebene des Spindelapparates an (Kim et al., 2000). Die Spindelfasern werden nun an einer Seite der Schwesterchromatiden ausgebildet. Dadurch wird es ermöglicht, dass in der folgenden Anaphase die kompletten homologen Chromosomen durch die Spindelfasern zu den Polen gezogen werden. Die darauffolgende erste Telophase ist gekennzeichnet durch eine Zytoplasmateilung, die zur Ausschleusung eines homologen Chromosomensatzes in Form des ersten Polkörperchens führt. Während der Telophase kommt an jedem Pol nur noch ein Chromosom (mit zwei Chromatiden) zu liegen. Mit der Abschnürung des Polkörperchens kommt es zur Ausschleusung eines homologen Chromosomensatzes und damit zur Reduktion der Chromosomen zu einem haploiden Satz. Damit ist die erste meiotische Teilung abgeschlossen. In der zweiten meiotischen Teilung werden die haploiden Chromosomen in die Chromatiden geteilt. Dies geschieht beim Pferd erst nach der Penetration eines Spermiums, nachdem die Oozyte im Metaphase-II-Stadium aus dem reifen präovulatorischen Follikel in den Eileiter gelangt. Erst jetzt wird die zweite Ana- und Telophase durchlaufen, und es kommt zur Ausschleusung des zweiten Polkörperchens (Schnorr, 2011).

4.2. Metabolismus des Kumulus-Oozyten-Komplex während der Maturation

Während der Follikulogenese teilen sich die Granulosazellen in zwei anatomische und funktionelle Subtypen auf. Sie bilden einerseits die Kumulusgranulosazellen, welche die Oozyte direkt umgeben und in engem metabolischen Kontakt zu ihr stehen, und andererseits die muralen Granulosazellen, welche die Follikelwand auskleiden (Gilchrist et al., 2004). Die hochspezialisierten Kumuluszellen interagieren metabolisch durch die Zona pellucida via gap junctions. Diese Konstitution wird als Kumulus-Oozyten-Komplex bezeichnet (KOK) (Albertini et al., 2001). Durch die gap junctions (GJA4, GJA1) wird der Austausch von

Molekülen wie Ionen (z.B. Calcium), Metaboliten (z.B. Pyruvat, Nucleinsäuren und Inositol), Aminosäuren (z.B. Alanin, Histidin und Leucin) und intrazellulären Molekülen (z.B. cAMP, cGMP) ermöglicht, welche für das Oozytenwachstum essentiell sind. Dieser Austausch erfolgt sowohl zwischen den Kumuluszellen und der Oocyte, als auch zwischen den Kumuluszellen untereinander. Die gap junctions sind unverzichtbar, weshalb die Absenz von GJA4 oder GJA1 das Follikel- und Oozytenwachstum unterbricht (Gittens and Kidder, 2005). Ein zweiter wichtiger Kommunikationsweg zwischen Oocyte und Kumuluszellen stellt die parakrine Signalisierung dar. In den letzten 10-15 Jahren hat man herausgefunden, dass eine Vielzahl an Stoffen von der Oocyte selbst sekretiert werden, welche eine fundamentale Rolle auf die Funktion, Differenzierung und Expansion von Kumuluszellen haben (Gilchrist et al., 2004). Am Beispiel von Glukose kann man die Abhängigkeit der Oocyte von den Kumuluszellen sehr gut darstellen. So können von Kumuluszellen umgebende Oozyten während der Maturation Glukose als die einzige Energiequelle im Maturationsmedium nutzen. Demgegenüber können entkumulierte Oozyten nur mit Pyruvat im Medium maturiert werden. Dies weist darauf hin, dass Oozyten nicht in der Lage sind, Glukose als Energiequelle zu nutzen, und auf die Kumuluszellen angewiesen sind, die Glukose zu Pyruvat umwandeln, welches via gap junctions zur Oocyte transferiert wird (Donahue and Stern, 1968; Leese and Barton, 1985). Die Umsetzung von Glucose wird über Glykolyse, den Pentose Phosphat Stoffwechselweg (PPP), den Hexosamin Biosynthese Stoffwechselweg (HBP) und den Polyol Stoffwechselweg durchgeführt (Sutton-McDowall et al., 2010). Dabei werden Enzyme synthetisiert, welche für die nukleäre Maturation, das Redoxpotential innerhalb der Oocyte, die Energieproduktion und für die Kumulusexpansion verantwortlich sind. In einer Studie von Sutton McDowall et al. (2010) wurde gezeigt, welchen Einfluss die Glukosekonzentration auf die Oocyte hat. Alterationen im Glukosemetabolismus bewirken eine reduzierte Kapazität der Oocyte, die vollständige Entwicklungskompetenz zu erlangen. So sind zu hohe Glukosekonzentrationen, etwa bei Typ I Diabetes, oder zu tiefe Glukosekonzentrationen, z.B. bei Abmagerung, mit einer verminderten Fertilität assoziiert. Das gleiche konnte auch *in-vitro* durch die Zugabe von entweder zuviel oder zu wenig Glukose zu den Kulturmedien gezeigt werden (Sutton-McDowall et al., 2010). Oozyten metabolisieren Pyruvat durch oxidative Phosphorylierung, um Energie für das Wachstum und die Maturation zu erzeugen (Biggers et al., 1967; Eppig, 1976). Tatsächlich ist während der Maturation bei Metaphase I Oozyten ein erhöhter Verbrauch an Pyruvat, verglichen mit unreifen Oozyten oder Oozyten in der Metaphase II nachzuweisen (Downs et al., 2002). Dies belegt auch eine neuere Studie, wo Transkripte glykolytischer Schlüsselenzyme vermehrt in Kumuluszellen, nicht aber in Oozyten, detektiert wurden (Sugiura et al., 2005). Umgekehrt stehen die Kumuluszellen in Abhängigkeit von Signalen, welche von der Oocyte kommen. Für die KOK Expansion ist der „cumulus expansion enabling factor“ (CEEF) verantwortlich, welcher *in-vivo* durch den LH Anstieg und *in-vitro* durch die EGF Faktoren und das follikelstimulierende Hormon FSH ausgelöst wird (Buccione et al., 1990). Dieser Faktor spielt eine zentrale Rolle in der Formation und Stabilisation der Moleküle, welche die mukoide Matrix des KOK bilden. Im Zusammenhang mit FSH wird von der Oocyte die cumulus cell hyaluronan synthase-2 (HAS-2) mRNA gebildet, was zur Produktion von Hyaluronsäure führt (Salustri et al., 1990). Es ist nicht bekannt, ob die Oocyte für die Regulation von den hyaluronbindenden Proteinen inter-alpha-trypsin inhibitor (ITI) und tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6), die es in

der KOK Matrix gibt, verantwortlich ist (Nagyova et al., 2000). Als weitere von der Oozyte parakrin sezernierte Faktoren, die Einfluss auf die Funktion der Kumuluszellen nehmen, zählen die zur Familie der transforming growth factors β (FGF β) gehörenden Mitglieder growth differentiation factor 9 (GDF9) und bone morphogenic protein 15 (BMP15), welche in den meisten Säugetierspezies exprimiert werden (Juengel and McNatty, 2005). GDF9 und BMP15 scheinen eine wichtige Rolle in der Follikulogenese und der Ovulation zu spielen, wie dies in Kapitel 4.1.2 bereits beschrieben wurde (Dong et al., 1996; Yan et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass 24 h nach hCG Administration eine deutliche Erhöhung der BMP15 Konzentration gemessen werden konnte (Yan et al., 2001; Su et al., 2004).

4.3. Limitationen bei der Maturation von Eizellen *in-vitro*

Equine Oozyten können zum Zeitpunkt der Gewinnung aus dem Ovar in Oozyten mit kompaktem Kumulus (Cp) und in Oozyten mit expandiertem Kumulus (Ex) unterschieden werden. Normalerweise weisen 25-40% der Oozyten einen kompakten Kumulus, und 50-60% einen expandierten Kumulus auf. Etwa 10% der Oozyten sind degeneriert (Choi et al., 2003). Oozyten mit Cp Kumulus stammen meistens aus kleineren Follikeln und haben eine schlechtere Maturationsrate als Oozyten mit Ex Kumulus (Alm et al., 1997). Dies widerspiegelt sich auch in der Trächtigkeitsrate nach dem Oozytentransfer in den Eileiter einer Empfängerstute von *in-vivo* und *in-vitro* maturierten Oozyten. *In-vivo* maturierte Oozyten weisen eine Trächtigkeitsrate von 75%-82% auf, wohingegen *in-vitro* maturierte Oozyten nach dem Transfer mit 17% eine sehr tiefe Trächtigkeitsrate aufweisen (Scott et al., 2001). Es muss also eine Vielzahl von Faktoren geben, welche die *in-vitro* Maturation von Oozyten beeinflusst. So spielt vor allem die Temperatur und, Zeit, wie lange die Ovarien nach dem Schlachten gelagert werden, und der Zeitraum von der Oozytengewinnung bis sie in das Maturationsmedium gelangen, sowie das Maturationsmedium mit seinen Inhaltsstoffen eine entscheidende Rolle für die Entwicklungskompetenz der Oozyten (Hinrichs et al., 2005). Um den Effekt der Temperatur auf die Maturationsrate der equinen Oozyten zu untersuchen, wurde die initiale Chromatinkonfiguration von Oozyten, die aus Schlachthausovarien gewonnen wurden, untersucht (Love et al., 2002). Die dabei gewonnen Oozyten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus dem Maturationsmedium genommen, mit Formalin fixiert, und anschliessend mit der Hoechst-33258 Färbelösung angefärbt. Als Maturationsmedium wurde ein modifiziertes Medium aus Earl's und Hank's Salz und dem tissue culture medium 199 (TCM199) verwendet. Die Hank's Lösung beinhaltet einen Phosphatpuffer, welcher den pH auch bei tiefer CO₂ Atmosphäre aufrechterhält. Die gleiche Wirkung hat die Earl's Lösung, welche hingegen auf einem Bicarbonatpuffersystem beruht. Eine weitere Puffersubstanz wäre das phosphat bufferd saline (PBS), was sich aber schlecht als Medium für die Kultivierung eignet, weil es mit dem zellulären pH und der Kalziumhomeostase interagiert (Lane et al., 1999). Die Chromatinkonfiguration wurde eingeteilt in Oozyten mit fluoreszierendem Nucleus (FN), Oozyten mit kondensiertem Chromatin (CC), und Oozyten mit fibrillärem, intermediärem, oder faserigem Germinalvesikel (GV). Bei FN Oozyten ist der ganze GV homolog fluoreszierend, wohingegen bei CC Oozyten das Chromatin in einer Masse innerhalb des GV sichtbar ist. Oozyten mit dichten, gut abgegrenzten Strängen von Chromatin im GV wurden als fibrillär definiert, solche mit grossen irregulären Massen von

Chromatin als intermediär, und solche mit einem ausgeprägten GV-Umriss von irregulärer Gestalt mit heterogenem Inhalt, als faserig. Die letzten drei Chromatinkonfigurationen wurden als nicht FN/CC eingeteilt. Im juvenilen GV (Meiose inkompetent) ist das Chromatin überall im Nukleus verteilt. Wenn die Oozyte die meiotische Kompetenz erlangt, beginnt das Chromatin zu aggregieren und kondensiert schliesslich zu einer zuerst losen und dann festen ovalen Masse im GV, was die CC Konfiguration widerspiegelt. Es ist nicht ersichtlich, aufgrund welcher Faktoren (z.B. Stickstoffkonzentration, Medium) bei Raumtemperatur mehr Oozyten die Metaphase II erreichen. Das Resultat dieser Studie zeigt, dass bei Oozyten, welche über eine Zeitperiode von 1-4 h bei Raumtemperatur (22°C-26°C) inkubiert wurden, die Chromatinkonfiguration von FN, CC, fibrillär/intermediär und fibrösem GV zu primär FN und CC wechselt. Die biologische Signifikanz der FN Konfiguration ist unklar. Es kann entweder als eine Progression oder als eine artifaktuelle Erscheinung gedeutet werden (Love et al., 2002). Die CC Chromatinkonfiguration ist die einzige GV Konfiguration, welche in Oozyten mit expandiertem Kumulus gesehen wurde, und diese Oozyten haben auch eine hohe Maturationsrate. Das wurde auch in anderen Studien gezeigt, in denen die CC Chromatinkonfiguration stark mit meiotischer Kompetenz korreliert ist (Hinrichs and Williams, 1997; Hinrichs and Schmidt, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Oozyten mit Cp Kumulus, welche zuerst 1-4 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden, eine höhere meiotische Entwicklungsrate aufweisen, als solche, welche unmittelbar bei 38.5°C inkubiert wurden. Man muss bedenken, dass für die IVM die KOK's verfrüht aus dem Follikel genommen werden. Diese würden *in-vivo* noch längere Zeit in der Meiose arretiert bleiben. Die Wiederaufnahme der Meiose geschieht *in-vitro* aber sehr schnell, ungeachtet vom Ausmass der Entwicklung der Oozyte. Spontane IVM bewirkt einen abrupten und prämaturnen „breakdown“ vom Oozyten-Kumuluszellen-gap junctions Kommunikationsweg, was zu einem Verlust an Metaboliten wie Ionen, Nukleotiden, und Aminosäuren führt (Thomas et al., 2004). Dies erschwert häufig den zeitlichen Ablauf im Labor in der Verarbeitung von Oozyten. Deshalb ist man auf die Idee gekommen, die Meiose der Oozyten zu supprimieren und damit zu synchronisieren. Dies wurde mit der Behandlung der Oozyten durch Roscovitine, einem Purinanalogon erreicht, welches den M-Phase promoting factor inhibiert. Einen Meiose supprimierenden Effekt ohne nachfolgenden Verlust der Blastozystenbildung wurde schon bei bovinen Oozyten gezeigt (Mermillod et al., 2000). Das gleiche wurde beim Pferd von Choi et al. (2006b) gezeigt (Choi et al., 2006b). Auch hier hat Roscovitine keinen negativen Einfluss auf die Blastozystenbildung, sondern es wurden sogar mehr Embryonen aus Roscovitine behandelten Cp Oozyten gebildet als aus Oozyten in der Kontrollgruppe. Dies gilt aber nicht für Oozyten mit expandiertem Kumulus. Ex Oozyten haben eine tiefere Entwicklungsrate zu Blastozysten, wenn sie vor der Maturation mit Roscovitine behandelt wurden (Choi et al., 2006b). Die Behandlung von Cp Oozyten mit Roscovitine ist also eine gute Methode, um den Zeitpunkt der Maturation von Oozyten zu synchronisieren, was den Arbeitsablauf im Labor in der Anwendung für IVF und ICSI vereinfacht. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der Gebrauch von einem modifizierten Earl's/Hank's M199 (EH), auch ohne Meioseinhibitoren, Oozyten bei Raumtemperatur im meiotischen Ruhestadium hält (Choi et al., 2006a; Choi et al., 2007; Hinrichs et al., 2012). Die Blastozystenrate war im EH Medium sogar höher als in mit Roscovitine beinhaltendem Medium (Choi et al., 2007). Wieso es beim Gebrauch von EH zu einer meiotischen Arretierung kommt, ist noch unbekannt. Man

geht davon aus, dass die Haltetemperatur verantwortlich für den Reifungsstop der Oozyte ist (Martino et al., 2014). Dieses Phänomen wurde auch von Galli et al. (2014) gezeigt, der Oozyten aus Schlachthausovarien 18 h vor der *in-vitro* Maturation bei Raumtemperatur (22°C-25°C) gehalten hat und mit dieser Methode einen positiven Effekt auf die Entwicklungskompetenz der Oozyten zeigen konnte. Oozyten, welche bei Raumtemperatur in Hepes (doppelionischer Puffer, welcher den pH unabhängig von der CO₂ Atmosphäre aufrechterhält) gehalten wurden, zeigten eine erhöhte Anzahl der CC Konfiguration (55.55%), verglichen mit der Kontrollgruppe, welche in IVM Medium gehalten wurden (46.42%). Auch die Blastozystenrate bei Raumtemperatur-Maturation war mit 47% höher als jene im IVM Medium mit 38% (Galli et al., 2014). Obwohl ein Bedarf an Lagerungsmedien für immature equine Oozyten besteht, ist sehr wenig über den Effekt dieser auf den Metabolismus der Oozyten bekannt. Man weiss, dass die Bedingungen bei der *in-vitro* Maturation dramatischen Einfluss auf die Entwicklung von Oozyten haben. Das am weitesten verbreitete Kulturmedium ist TCM199. In den letzten Jahren wurden von verschiedenen Laboratorien andere Medien getestet, wie das Dulbecco's modified eagle Medium (DMEM-F12), supplementiert mit 15% Serum (Invitrogen, San Giuliano Milanese, Italien). Hormone und Wachstumsfaktoren wie fetales Kälberserum, insulin transferring sodium selenite, Pyruvat, long epidermal growth factor, insulin-like growth factor, FSH und LH wurden, wie aus einer früheren Studie ersichtlich, dazugegeben (Lagutina et al., 2005). Galli et al. (2014) zeigten einen klaren Vorteil von DMEM-F12 gegenüber TCM199 in der Meiose rate von Oozyten. Die empfohlene Zeit, wie lange man die Oozyten für eine IVM in DMEM-F12 belassen soll, ist für expandierte Oozyten zwischen 22-24 h und zwischen 26-36 h für kompakte Oozyten. Mit diesem Medium haben sich mehr Oozyten weiterentwickelt und mehr Embryonen zu Blastozysten entwickelt (Galli et al., 2008). Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Medien ist die Supplementation von den von Oozyten sekretierten Faktoren GDF9 und BMP15. Gilchrist und Thompson (2007) erzielten verbesserte Entwicklungsraten an Mäuseoozyten, wenn sie diese zwei Faktoren ins Medium gaben (Gilchrist and Thompson, 2007).

Um die metabolische Funktion einer Oozyte zu untersuchen, kann man die mitochondriale Aktivität bestimmen. Dies wurde durch Martino et. al. (2014) untersucht. Dazu wurde eine fluoreszenzmikroskopische Analyse des Energie/Redox Parameter in den Mitochondrien untersucht. Diese Untersuchung wurde bei Oozyten im GV Stadium durchgeführt, um den Effekt von EH und der Temperatur auf den Metabolismus der Oozyten zu untersuchen. So konnte festgestellt werden, dass EH keinen Effekt auf den Energie/Redox Status von equinen Oozyten hat, welche bei Raumtemperatur gehalten wurden, und dass die prämeiotische Chromatinkonfiguration und der mitochondriale Status abhängig von der Inkubationstemperatur sind (Martino et al., 2014). Zusammenfassend wurde in dieser Studie gezeigt, dass das Verbringen von Oozyten in EH Medium bei 25°C vor der *in-vitro* Maturation die Synchronisation von Oozyten und den Oozytentransport optimiert.

4.4. „Omics“ Untersuchungen in der assistierten Reproduktion beim Pferd

4.4.1. Einführung in die Omics Methoden

Die sogenannte Systembiologie ist ein neues und sich schnell entwickelndes Forschungsgebiet, welches Interaktionen von Zellkomponenten auf quantitativer Ebene untersucht und diese einem biologischen Prozess zuzuordnen. Dazu braucht es Messmethoden, welche eine grosse Anzahl von Molekülen auf einmal untersuchen können. Diese Methoden werden unter dem Begriff OMICS zusammengefasst. OMICS ist ein Überbegriff, der die Fachgebiete der Genomik, Transkriptomik, Proteomik, Lipidomik, Glykomik, und Metabolomik beinhaltet (<http://www.nature.com/omics/about/index-html>). Die Genomik und Transkriptomik untersucht die DNA und dessen Translationsprodukte, liefern also genetische Informationen und geben den Genotyp wieder. Proteomics und Metabolomics untersucht die Proteine und dessen dynamische Interaktion mit Metaboliten und fokussieren auf die Erforschung metabolischer Signalkaskaden, welche den Phänotyp eines Zellsystems widerspiegeln (Abb. 1).

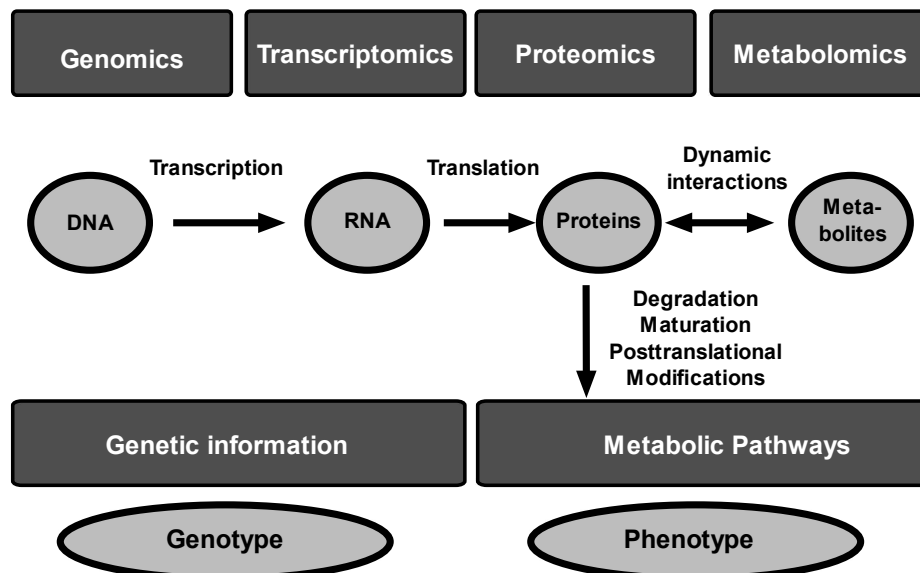


Abb. 1: Schematische Übersicht der OMICS Methoden Genomik, Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik.

Die Vorteile von OMICS Untersuchungen liegen darin, dass das Zusammenwirken von verschiedenen Molekülen auf biologisch relevante Zielsysteme erfasst werden kann. Anhand dieser Erkenntnisse können Biomarker identifiziert werden, welche für die Prognosestellung verschiedener Fragestellungen dienen können. Erste OMICS Untersuchungen über die Biologie der Oozyte wurden schon im letzten Jahrzehnt durchgeführt. Die ersten Forschungsergebnisse wurden auf dem Gebiet der Genomik, und Transkriptomik erzielt (Seli et al., 2010). Erst später wagte man sich in die Bereiche der Glykomik und Metabolomik vor (Dell'Aquila et al., 2004). In den folgenden Kapiteln soll ein kurzer Einblick in die verschiedenen Fachgebiete und deren Forschungsergebnisse in Bezug auf den weiblichen Gameten gegeben werden.

4.4.2 Genomik

Die Genomik beschreibt die Untersuchung von Variationen im Genom. Es wird eine systematische Analyse des vollständigen Genoms bzw. aller aktiven Gene einer Zelle, eines Gewebes, eines Organs oder eines ganzen Organismus durchgeführt. Ziele der Genomik sind ein besseres Verständnis der Evolution, die Identifizierung von Krankheitserregern und Erbkrankheiten sowie das Aufdecken von Regulationsmechanismen, z.B. bei der Entwicklung von Embryonen (Wang et al., 2012). Bezogen auf die Reproduktionsmedizin spielt die Chromosomenzahl eine zentrale Rolle. Sie ist verantwortlich für eine normale Embryonalentwicklung (Seli et al., 2010). Bei der IVF ist die Erscheinung von Aneuploidie (fehlerhafte Chromosomenzahl) im Vergleich zur natürlichen Fertilisation häufiger (Munne et al., 1995). Untersuchungen um solche Veränderungen festzustellen, erfordern die Durchführung einer Biopsie von Embryonen oder die Entnahme vom Polkörper einer Oozyte. Solche Eingriffe zählen zum Fachgebiet der Präimplantationsdiagnostik. Entsprechende Untersuchungen wurden bei der Stute durchgeführt, wobei es vor allem um die Geschlechtsbestimmung und der Aufdeckung von hereditären Krankheiten geht (Herrera, 2016). Vor allem bei Poloponys scheint die Stute eine bessere Leistung zu erbringen, weshalb die Geschlechtsbestimmung mittels Embryobiopsie eingeführt wurde. Herrera et al. (2014) konnten zeigen, dass die biopsierten Embryonen für 7-10 h in Holding Medium verbracht werden können, bis die Geschlechtsbestimmung vollendet ist, ohne die Trächtigkeitsrate negativ zu beeinflussen (Herrera et al., 2014). Um von der Chromosomenstruktur auf die Untersuchung von einzelnen Mutationen zu gelangen, wurde die Untersuchung von single nucleotide polymorphismen (SNP) eingeführt (Wells et al., 2008). Beim Pferd wurden SNP's identifiziert, welche mit sportlicher Leistung in Verbindung gebracht werden können. Diese genomische Selektion wurde zuerst in der Vollblutzucht etabliert und findet nun in anderen Rasseverbänden ihre Bedeutung (Hill et al., 2001). Es gibt ein SNP array für Pferde, in welchem mehr als 54'000 SNP Polymorphismen beschrieben sind (Doan et al., 2013). In einer Studie von Choi et al. (2010) wurden PCR Untersuchungen an biopsierten Embryonen durchgeführt. Es wurden 6 Tage alte Embryonen verwendet. Dabei wurde wiederum eine Geschlechtsbestimmung durchgeführt. Zusätzlich untersuchte man die Embryonen auf die genetisch vererbten Krankheiten HYPP (Hyperkalemic periodic paralysis) und HERDA (Hereditary equine regional dermal asthenia) (Choi et al., 2010). Eine weitere vielversprechende Anwendung in der Genomik ist die Erforschung der Epigenetik. Darunter werden erworbene Veränderungen an den Chromosomen zusammengefasst, die deren Aktivität beeinflussen, jedoch nicht durch eine Mutation oder aber Rekombination im Zusammenhang stehen. So können Veränderungen in der DNA Methylierung und die Deacetylierung von Histonen zu Gensuppressionen führen. Der Genotyp der Zellen wird nicht verändert, jedoch der Phänotyp beeinflusst. Dies ist auch von besonderer Bedeutung für das Entwicklungspotential von Oozyten. Es konnte bei bovinen Oozyten gezeigt werden, dass die Oozytenqualität zunimmt, je geringer der Methylierungsgrad der DNA ist (Fagundes et al., 2010).

4.4.3 Transkriptomik

Das Transkriptom ist die gesamte RNA, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle oder einer Zellpopulation vorhanden ist. Das Transkriptom ist dynamisch, da die Stufen von RNA-Transkripten während der verschiedenen Entwicklungsstadien variieren (Cavill et al., 2010). Die Transkription in der Oozyte ruht während der Maturation. In dieser Phase ist die Kommunikation zwischen der Oozyte und den umgebenden Kumuluszellen wichtig. Der Signalaustausch funktioniert in dieser Phase über den parakrinen Weg wie auch über Gap Junctions. Es konnte bei bovinen Oozyten gezeigt werden, dass sogar mRNA und RNA zwischen Oozyte und Kumuluszellen ausgetauscht werden (Macaulay et al., 2014). Die Resultate dieser Studie unterstreichen die Abhängigkeit der Oozyte von den umgebenden Kumuluszellen, da sie für eine vollständige Maturation verantwortlich sind (Macaulay et al., 2014). Ein wichtiges Ziel in der Transkriptomik von Oozyten ist die Aufdeckung von Unterschieden in der Genexpression zwischen verschiedenen Maturationsstadien, speziell zwischen dem GV und der Metaphase II. Dabei wird auch auf Unterschiede zwischen *in-vivo* und *in-vitro* maturierten Oozyten untersucht. Erste solche Studien in der Transkriptomik wurden bei Tieren zuerst an Mäusen und dann auch bei Grosstieren durchgeführt (Thelie et al., 2009). Dalbies-Tran und Mermillod (2003) führten eine erste Studie durch, in der die Genexpression von bovinen Oozyten untersucht wurde. Sie analysierten die Genexpression vor und nach IVM. Dabei konnten 300 Gene reproduzierbar nachgewiesen werden. 70 Transkripte zeigten signifikant unterschiedliche Regulation zwischen den verschiedenen meiotischen Stadien. Diese Informationen zeigten eine erste molekulare Signatur der Maturation von Oozyten (Dalbies-Tran and Mermillod, 2003). Man konzentrierte sich dann immer mehr auf den Unterschied im Transkriptom zwischen *in-vivo* und *in-vitro* maturierten Oozyten. Zudem erfolgten Analysen an Kumulus-, Granulosa- und Thekazellen, weil diese eine Beurteilung der Oozytenqualität erlauben, ohne Manipulationen an der Oozyte selbst vorzunehmen. Regassa et al. (2011) untersuchten den Unterschied vom Transkriptom zwischen Kumuluszellen und Oozyten beim Rind. Sie konnten verschiedene Faktoren, während der Maturation bestimmen, die nur von Kumuluszellen exprimiert wurden. Diese hatten einen Effekt auf die Genexpression von Oozyten während den verschiedenen Maturationsstadien (Regassa et al., 2011). Das zeigt einmal mehr die wichtige Kommunikation zwischen Kumuluszellen und der Oozyte. Beim Pferd wurden erst wenige Untersuchungen zur Transkriptomik über Granulosa und Kumuluszellen durchgeführt. Cox et al. (2015) untersuchten die Expression von Genen in Kumulus-Oozyten-Komplexen von jungen und alten Stuten (Cox et al., 2015). In einem ähnlichen Versuchsansatz untersuchten Sessions-Bresnahan et al. (2015) altersassoziierte Veränderungen von Granulosazelltranskripten aus equinen präovulatorischen Follikeln (Sessions-Bresnahan et al., 2016). Fahiminiya et al. (2011b) untersuchten Transkriptome von Granulosa- und Thekazellen aus equiner Follikelflüssigkeit in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Sie verglichen unreife Follikel mit dominanten Follikeln 34h nach der Verabreichung von Gonadotropin. Sie konnten zeigen, dass zwischen präovulatorischen Follikelstadien und dominanten Follikeln 8349 Transkripte in Granulosazellen und 2338 Transkripte in Thekazellen unterschiedlich exprimiert waren (Fahiminiya et al., 2011b).

4.4.4. Metabolomik

Die Metabolomik befasst sich mit chemischen Prozessen und deren Metaboliten innerhalb eines biologischen Prozesses. Das Metabolom repräsentiert die Kollektion von allen Metaboliten einer Zelle, eines Organs oder Organismus, als Endprodukt von zellulären Prozessen. Dazu gehören beispielsweise Hormone oder Signalmoleküle (Daviss, 2005).

In der assistierten Reproduktion hat sich die Analyse von Follikelflüssigkeit zur Untersuchung der Oozytenqualität als nützliches und nicht invasives Mittel herausgestellt. Heutzutage kann man durch die Entwicklung der Massenspektrometrie nicht nur einzelne Metaboliten identifizieren, sondern breiter gefächerte Versuchsansätze auf Metabolomebene durchführen. Die Untersuchung der Follikelflüssigkeit befindet sich erst in den Anfängen. Erste Ergebnisse geben jedoch Hinweis, dass eine Korrelation zur Entwicklungskompetenz von KOKen hergestellt werden kann (Revelli et al., 2009). Bei der Stute wurde eine entsprechende Metabolomikstudie durchgeführt, in der die Follikelflüssigkeit von verschiedenen Follikelstadien charakterisiert wurde. Es wurden 14 Metaboliten gefunden, die in viel höheren Konzentrationen in grossen Follikeln, als in kleinen Follikeln vorkamen. In der gleichen Studie wurde analoges beim Rind und beim Wildschwein durchgeführt (Gerard et al., 2015).

Aerobe und anaerobe Metabolisierungswege sind für die Entwicklung des präimplantierten Embryos verantwortlich (Leese, 1995), was *in-vivo* in der Follikelflüssigkeit und *in-vitro* im Kulturmedium möglich ist. Die metabolische Untersuchung dieser Flüssigkeiten kann nützliche Informationen zur Vorhersage einer erfolgreichen Embryonalentwicklung liefern (Singh and Sinclair, 2007). In einer Studie von Nagy et al. (2009) wurden Kulturmedien, welche verschiedene Oozytenstadien beinhalteten, metabolisch untersucht. Bei der metabolischen Analyse konnte man verschiedene Entwicklungskompetenzen der Oozytenstadien aufzeigen. Man konnte ein metabolisches Muster erkennen, welches mit einer erhöhten Embryonalen Entwicklungsrate korrelierte (Nagy et al., 2009). In einer Studie bei der Stute wurde der Einfluss einer Obesitas auf die Hormonzusammensetzung im präovulatorischen Follikel und dem Lipid-Fingerprint der Oozyten mittels Massenspektrometrie untersucht. Man stellte fest, dass die Fettleibigkeit Alterationen in der Zusammensetzung von Follikelflüssigkeit und Lipidmuster in der Oozyte verursachte. Inwiefern diese Veränderungen einen Einfluss auf die Entwicklungskompetenz von Embryonen haben, muss noch näher untersucht werden (Sessions-Bresnahan et al., 2016).

4.5. Proteomik

4.5.1. Definition Proteom

Unter dem Begriff Proteom wird die Studie der Gesamtheit aller exprimierten Proteine eines Lebewesens, eines Gewebes oder eines Zellkompartimentes unter exakt definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt verstanden. Die Anzahl dieser Proteine steht in Verbindung zur Anzahl Genen in einem Organismus. Diese Beziehung ist nicht direkt, weil das Proteom von einer Vielzahl von Umweltfaktoren beeinflusst wird. Es muss in der Definition berücksichtigt werden, dass für die Untersuchung des Proteoms, nicht ein einziges Individuum einer Spezies, für die Untersuchung des Proteoms herbeigezogen werden

kann. Da es eine Vielzahl an Isoformen, Mutationen, und Variationen von Proteinen gibt, muss für die Analyse des Proteoms Probenmaterial aus verschiedenen Individuen verwendet werden (Wright et al., 2012). Der Vorteil von Proteomikanalysen ist der geringe Bedarf an Probenmaterial. Die Signalintensität eines Peptids im Massenspektrometer korreliert mit seiner Konzentration in der Probe. Somit ist es möglich, anhand seiner Signalintensität ein bestimmtes Peptid über mehrere Proben hinweg relativ zu quantifizieren, ohne riesige Probenmengen zu entnehmen. Dank Proteindatenbanken kann man die analysierten Peptide dem richtigen Protein zuordnen. Die Anzahl proteinkodierender Gene wird beim Pferd, ähnlich wie bei anderen Säugetieren, auf ca. 20'300 Gene geschätzt (Wade et al., 2009). Gemäss einer Studie von Bundgaard et al. (2014) sind vom Pferdeproteom 2636 Proteine identifiziert. Diese setzten sich aus 24131 charakterisierten Peptiden zusammen (Bundgaard et al., 2014). Man geht davon aus, dass nur alleine im Proteom von Embryonen über eine Million verschiedene Proteine vorkommen (Katz-Jaffe and Gardner, 2007). Diese Zahlen geben uns einen Hinweis auf die extreme Vielfalt und Variabilität, mit der man bei der Untersuchung des Proteoms zu tun hat. Als Beispiel dafür sind Antikörper zu nennen, welche ihre Antigen bindende Region in unzählig verschiedenen Sequenzen während des Lebens ändern, ohne dass diese Sequenzen von Genen codiert sind. Sie sind auch ein gutes Beispiel für extern beeinflusste Proteine, weil das ganze Leben lang immer wieder neue Antikörper auf neue Antigene exprimiert werden (Boutz et al., 2014). Es gibt viele andere externe Einflüsse wie z.B. Temperatur, Alter, Stress, Medikamente, Hormone, welche das Proteom beeinflussen. Eine weitere mögliche Modifikation bei der Expression von Proteinen ist das splicen. Proteine werden von mRNA translatiert. Diese mRNA können gespliced werden, um verschiedene endgültige mRNAs zu formen. Splicing ist z.B. vermehrt bei der Maturation von Zellen anzutreffen.

4.5.1.1. Glykomik

Um die Auswahl der bisher genannten Variabialitäten des Proteoms zu komplettieren, sei die posttranslationale Modifikation (PTM) erwähnt. Darunter versteht man die Glykosilierung, Phosphorylierung und Methylierung von Proteinen. Diese Modifikationen spielen im Ablauf von Signalkaskaden eine wichtige Rolle (Hipkiss, 2006). Bei der Glykomik wird die Struktur und Funktion von Glykanen und Karbohydraten untersucht. Lektin basierende Untersuchungen sind das wichtigste Werkzeug bei der Glykomik, weil Lektin spezifisch an Karbohydrate bindet. Es gibt eine Studie, in der bei equinen Oozyten Lektinuntersuchungen zur Bestimmung der Oozytenqualität herbeigezogen wurden. Man untersuchte Glykoproteine bei kompakten und expandierten Kumuluszellen und fand Unterschiede in der Lektinbindung. Solche Erkenntnisse, dass Glukose in verschiedenen Zelltypen in verschiedenen Formen vorkommt, könnte als Model für die Beurteilung der Oozytenqualität herbeigezogen werden (Desantis et al., 2009). Solche Glykomik Untersuchungen wurden in einer Arbeit von Accogli et al. (2014), bei equinen und porcinen Kumuluszellen durchgeführt. Sie untersuchten die unterschiedliche Expression von Glykosidresten in *in-vitro* und *in-vivo* maturierten KOK's mittels Lektin Histochemie. Der Vergleich zeigte Unterschiede in der Präsenz und Verteilung von Karbohydraten, welche in Verbindung mit der Entwicklungskompetenz von IVM KOK's gebracht werden konnten. Zusätzlich konnten tierartliche Unterschiede zwischen Pferd und

Schwein im Verteilungsmuster der Glykosidreste in den Kumuluszellen festgestellt werden. Es stellte sich heraus, dass das Glykanprofil beim Pferd viel komplexer aufgebaut ist als beim Schwein. Generell ist aber die quantitative Expression von Glykanen in präovulatorischen KOK's in beiden Spezies niedriger, als in Antralfollikeln (Accogli et al., 2014).

Zusammenfassend sei erwähnt, dass das Proteom nicht nur direkt mit dem Genom, sondern auch mit vielen anderen Einflüssen, wie oben erwähnt, in Verbindung steht. Es ist also im Vergleich zum statischen Genom dynamisch.

4.5.2. Methodische Einführung in die Proteomikanalyse

In diesem Kapitel soll ein Überblick über die wichtigsten Methoden in der Proteomanalyse gegeben werden. Wenn man ein Proteom untersuchen will, muss es zuerst in seine einzelnen Proteine aufgetrennt werden, um es effizient zu analysieren. Die Proteomik stellt also den Fokus auf die Verbesserung von Separationsmöglichkeiten des Proteoms (Wright et al., 2012). Eine traditionelle Methode stellt die 2D Gelelektrophorese dar. Sie dient zur Auftrennung von Proteingemischen. Sie bietet die Möglichkeit, das Proteinspektrum eines Organismus oder Gewebes in einem definierten Stadium abzubilden und weiter zu untersuchen. Zwei unterschiedliche Trennprinzipien kommen zum Einsatz. In der ersten Dimension erfolgt die Trennung nach dem isoelektrischen Punkt und anschliessend in der zweiten Dimension nach der molekularen Masse der Proteine. Für die erste Dimension werden immobilisierte pH-Gradienten (IPG) benutzt, die in einem Gelstreifen fixiert werden. Der Gelstreifen besteht aus einer Polyacrylamidmatrix. Durch Einpolymerisation in die Matrix kann sich der pH-Gradient nachträglich nicht mehr verändern. Die zweite Dimension, die Separation von Proteinen mittels Elektrophorese basiert auf der Tatsache, dass die geladenen Moleküle durch eine Matrix (Agarosegel oder Acrylgel) wandern, wenn man sie an ein elektrisches Feld anschliesst (Garfin, 2003). Die Gelelektrophorese ist aber stark limitiert in der Detektion von variierenden Proteinkonzentrationen. Auch einzelne Peptide können mit dieser Methode nicht zuverlässig analysiert werden (Speicher et al., 2004).

Eine Revolution in der Proteomik war dann die Einführung der Massenspektrometrie (MS). Ohne MS wäre die Proteomik, so wie wir sie heute kennen, nicht möglich. Ein Massenspektrometer ist ein Gerät, mit dem aus einer gasförmigen Probe Ionen erzeugt, nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis getrennt und registriert werden können. Weil Biomoleküle fast nicht verdunsten, muss man sie irgendwie in die Gasphase bringen. Dies gelingt, indem man die Moleküle ionisiert und verdampft, ohne die Proteine bzw. Peptide zu beschädigen (Budzikiewicz and Grigsby, 2006). Die entstandenen Ionen werden beschleunigt und zu einem Strahl gebündelt. Die Ionisation erfolgt meist durch Elektronenstossionisation. In der Iontrennung werden die Ionen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) mittels statischer oder dynamischer Methoden getrennt. Mittels dynamischer Methoden erfolgt die Iontrennung in Flugzeitmassenspektrometern, in denen die Trennung auf der massenabhängigen Geschwindigkeit der Ionen beruht, oder in Quadrupolmassenspektrometern, in denen der Ionenstrahl zwischen vier stabförmige Pole eines elektrischen Wechselfeldes gelenkt wird. Nur diejenigen Ionen, die im Takt des Wechselfeldes ihre Richtung ändern, werden vom Massenfilter durchgelassen. Zum

Ionennachweis wird der im Wechselfeld entstehende Spannungsabfall gemessen. Mit Lichtpunktschreibern können die Spektren in wenigen Sekunden registriert werden. Da zahlreiche im Massenspektrometer anfallende Informationen leicht digitalisiert werden können, hat sich die Kopplung von Massenspektrometern mit Computern durchgesetzt (Zhen et al., 2004). Um noch genauere Informationen von einem bereits mit MS gemessenen Protein/Peptid zu erhalten, kann man dieses fragmentieren. Die fragmentierten Massen werden dann nochmals mit MS gemessen. Dieses Verfahren wird als sekundär MS, MS/MS, MS2, oder tandem MS bezeichnet (Guerrera and Kleiner, 2005). Trotz dieser fortgeschrittenen Technologie, ist es nicht immer möglich ein Protein oder Peptid vollständig zu detektieren. Manche Moleküle lassen sich nur sehr schwer proteolytisch verdauen oder lassen sich im Massenspektrometer gar nicht verflüchtigen. Zwecks dieser Schwierigkeiten hat man über Jahrzehnte verschiedene Proteindatenbanken erstellt. Aufgrund von zum Teil empirisch erhobenen Daten findet man dort Informationen zu bestimmten Proteinen und den ihnen zu Grunde liegenden Peptiden. Es existieren komplexe Softwareinstallationen, welche berechnen können, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein bestimmtes Peptid aus einer Probe zu einem bereits bekannten Protein gehört. Für das Pferdeproteom existiert die Datenbank „Equine Peptidatlas“. Es ist zurzeit die grösste öffentliche Informationsquelle über Proteine beim Genus Equus (Bundgaard et al., 2014).

Bei der Proteomikanalyse muss zwischen zwei unterschiedlichen Ansatzweisen unterschieden werden: Soll ein komplettes Protein als Ausgangspunkt für die MS verwendet werden, spricht man von Top-down Proteomik. Bei der Bottom-up Proteomik - oder auch Shotgun-Proteomics – wird eine Mischung von Proteinen mittels Trypsin in ihre Peptide verdaut, welche dann separiert und analysiert werden. Die hieraus resultierenden Fragmente trennt man über Elektrophorese und Chromatografie auf und analysiert sie dann im Massenspektrometer. Die Sequenzen der Fragmente werden anschliessend mit Sequenzen, die bereits in Protein-Datenbanken gespeichert sind, verglichen und dann mit einzelnen Proteinen zugeordnet. Auf diese Weise kann mit hoher Genauigkeit sehr viele Proteine identifiziert werden (Speicher et al., 2004; Wysocki et al., 2005). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde ein „label-free untargeted Shotgun-Proteomics“ Ansatz ausgewählt, um ein möglichst breites Bild über die Unterschiede im Kumulusproteom der beiden Oozyten Maturationsbedingungen (*in-vivo* versus *in-vitro*) zu bekommen.

Bei diesem Ansatz werden die Zellen mit einem denaturierenden Puffer isoliert und direkt mit Trypsin hydrolysiert. So wird eine immense Zahl an Peptiden generiert, welche nachfolgend mittels high performance liquid chromatography (HPLC) aufgetrennt werden. Die am häufigsten angewendete Separationsmethode ist die „reverse-phase“ Chromatografie, wobei die Peptide im sauren Milieu nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt werden. Wird die HPLC-Säule direkt mit dem Massenspektrometer als Detektor verbunden, spricht man von einem LC-MS- oder LC-MS/MS-System. Die so separierten Peptide werden dann mit dem MS analysiert und mit der „in silico“ Datenbank verglichen, um Peptid- bzw. Proteinzuordnungen zu erhalten. Bei sehr komplexen biologischen Proben können zwei oder mehr orthogonale Chromatographieverfahren (z.B. Ionenaustauschchromatografie/ „reverse phase“ Chromatografie) kombiniert werden, um eine bessere Peptididentifizierung zu erreichen.

Die labelfreie Quantifizierung kommt, wie der Name schon vermuten lässt, ohne eine zusätzliche Markierung der Analyten aus. Grundlage bildet die Tatsache, dass Peptide zwar unterschiedlich gut ionisierbar sind, die Signalintensität eines Peptids im Massenspektrometer aber dennoch mit seiner Konzentration in der Probe korreliert. Somit ist es möglich, anhand seiner Signalintensität ein bestimmtes Peptid über mehrere Proben hinweg relativ zu einander zu quantifizieren. Voraussetzung dieser Methode sind eine sehr gut reproduzierbare Chromatographie sowie Massenspektrometrie. Vorteile dieser Art der Quantifizierung sind ihr sehr sparsamer Probenverbrauch, niedrige Kosten, und die schnelle Durchführung. Sie eignet sich besonders, wenn eine grössere Anzahl von Proben quantifiziert werden soll (Patel et al., 2009).

4.5.3. Proteomik-Untersuchungen an Kumulus-Oozyten-Komplexen

Aufgrund der engen Kommunikation zwischen Kumuluszellen und der Oozyte und der Notwendigkeit der Kumuluszellen für eine erfolgreiche Maturation hat man sich Proteomik Analysen für ein besseres Verständnis von Kumulus-Oozyten-Komplexen zu Nutze gemacht. Bisher finden sich in der Literatur noch keine Studien, die das Proteom equiner Kumulus-Oozyten-Komplexe mittels Massenspektrometrie untersuchten. Für diverse andere Spezies, wie dem Rind, der Maus oder dem Menschen, finden sich jedoch exemplarische Untersuchungen. Hierbei muss jeweils differenziert werden, ob im Rahmen der Arbeiten der gesamte Kumulus-Oozyten-Komplex oder nur die Oozyten beziehungsweise der Kumulus analysiert wurde. Oozyten selbst sind exzellente Modelle für Proteomik-Studien dank des Überflusses an maternalen Proteinen, welche während der Oogenese in ihrem grossen Zytoplasma angereichert werden. Diese grosse Proteinmenge reduziert die nötige Anzahl an Oozyten, welche für die effektive Proteinextraktion gebraucht werden. Berendt et al. (2009) untersuchten den Unterschied des Proteoms von unreifen MI und IVM-MII bovinen Oozyten anhand gepoolten Proben mittels Massenspektrometrie. Es wurden unterschiedliche Proteinmuster bei den verschiedenen Oozytenstadien gefunden. Anschliessend führten sie eine Quantifizierung der gefundenen Proteine durch. Die so ermittelten Proteine gaben Aufschluss über die Qualität der Oozyten (Berendt et al., 2009). Memili et al. (2007) untersuchten das Proteom von maturierten bovinen Oozyten und Kumuluszellen in gepoolten Proben mittels 2D-LC-MS. In einer anderen Proteomikstudie wurden in gepoolten Proben nicht maturierte Oozyten und Kumuluszellen beim Rind massenspektrometrisch untersucht. Messungen wurde mittels LC-MS/MS durchgeführt (Peddinti et al., 2010). Im Rahmen der massenspektrometrischen Untersuchung werden die Oozyten jedoch konsumiert und stehen nicht mehr für die weiteren Versuche wie beispielsweise einer Fertilisation zur Verfügung. Durch die enge bidirektionale Kommunikation zwischen Kumuluszellen und Oozyte bis zur finalen Maturation stellt der Kumulus ein besonders interessantes Untersuchungsmaterial dar, mit dem der KOK Metabolismus nicht-invasiv für die Oozyte untersucht werden kann (Gilchrist et al., 2011). Dies macht den Kumulus auch als Material für die Suche nach Biomarkern für die Entwicklungskompetenz der korrespondierenden Oozyte interessant. Die bedingt jedoch oftmals, dass die Analysen auf Level einzelner KOK durchgeführt werden müssen, was eine besondere Anforderung an die Sensitivität der Analysemethoden stellt. Eine Studie an einzelnen KOK wurde durch Hamamah et al. (2006) durchgeführt. Sie untersuchten

die unterschiedliche Proteinexpression in maturierten Kumuluszellen vom gleichen Patienten nach zwei verschiedenen hormonellen Stimulationsprotokollen. Sie nutzten eine hochauflösende zweidimensionale Proteinelektrophorese nach metabolischer Markierung mit dem Radioisotop (^{35}S) Methionin. Es konnte eine starke Ähnlichkeit der Proteinexpression beim selben Patienten und beim selben Protokoll beobachtet werden, zwischen den Patienten gab es deutliche Unterschiede. In dieser Studie wurden die Unterschiede im Proteinmuster analysiert, ohne einer Identifikation der Proteine, die zwischen den Gruppen unterschiedlich exprimiert waren (Hamamah et al., 2006). Eine Untersuchung bei der LC-MS/MS verwendet wurde, in dem gepoolte Kumuluszellen untersucht wurden, kommt aus der Humanmedizin. Es wurde die unterschiedliche Proteinexpression in Kumuluszellen in Relation zum Alter des Donors untersucht. Die KOK wurden *in-vivo* entnommen. Es konnten 1423 Proteine aus MII Kumuluszellen identifiziert werden, wovon 7,7% in Abhängigkeit zum Alter des Donors unterschiedlich exprimiert waren (McReynolds et al., 2011). Beim Pferd wurden erst einzelne Proteinanalysen mittels Western Blot und Immunhistochemie vorgenommen. Eine Studie von Dell'Aquila et al. (2008) untersuchten den Einfluss eines Opioidrezeptors auf die meiotische Kompetenz. Als Probenmaterial wurden Oozyten und Kumuluszellen verwendet. Sie konnten zeigen, dass der Opioidrezeptor jahreszeitlich unterschiedlich exprimiert wird und einen saisonalen Einfluss auf die meiotische Kompetenz hat (Dell'Aquila et al., 2008). Proteomikstudien an einzelnen equinen Kumuluskomplexen wurden bisher noch nicht durchgeführt.

4.5.4. Unterschiede im Kumulus-Proteom zwischen *in-vivo* und *in-vitro* maturierten Oozyten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll das Kumulusproteom von Oozyten, die erfolgreich *in-vivo* oder *in-vitro* maturiert wurden verglichen werden. Oozyten, die unter *in-vitro* Bedingungen maturiert wurden, weisen im Vergleich zu *in-vivo* maturierten Oozyten eine deutlich reduzierte Entwicklungskompetenz auf (Kapitel 4.3.). Von besonderem Interesse für die assistierte Reproduktionsmedizin sind daher Untersuchungen, die sich mit den Abweichungen im KOK-Metabolismus unter *in-vitro* Bedingungen beschäftigen. In der Literatur finden sich dazu bislang noch keine Studien für die Spezies Pferd. Bei anderen Säugetieren wurden jedoch schon erste Untersuchungen in dieser Richtung durchgeführt. Salhab et al. (2013) untersuchten die Proteinexpression in bovinen Kumuluszellen nach *in-vivo* und *in-vitro* Maturation mittels Western Blot. Sie konnten 472 unterschiedlich exprimierte Proteine identifizieren, welche unter IVM Bedingungen in vermehrten Mengen vorkommen. Die überexprimierten Proteine konnten in die Funktionen für Zellbewegung, Zelladhäsion und der extrazellulären Matrix eingeteilt werden (Salhab et al., 2013).

Auf Ebene der Genexpression finden sich Studien, die Abweichungen in einem globalen „Omics“ Ansatz untersuchten. In einer Studie wurde die Genexpression von murinen Kumuluszellen mit einer Mikroarrayanalyse untersucht (Brown et al., 2017). Das Ziel war, einen Unterschied in der Genexpression zwischen *in-vivo* und *in-vitro* maturierten Oozyten nachzuweisen. Sie konnten aufzeigen, dass die Rolle des Epidermal-growth Faktors, die extrazelluläre Matrix, der Metabolismus der Kumuluszellen und das Immunsystem kritische Einheiten für eine erfolgreiche IVM.

4.6. Erwartete Relevanz der Ergebnisse

Für die IVF beim Pferd stellen die Maturationsbedingungen den entscheidenden limitierenden Faktor für eine erfolgreiche Maturation und spätere Fertilisation dar. Unterschiede im Proteinmuster zwischen *in-vivo* und *in-vitro* maturierten KOK können behilflich sein, die Maturationsmedien *ex-vivo* durch Adaptation an die *in-vivo* Bedingungen weiter zu optimieren. Die Ergebnisse sind dabei nicht nur für die equine assistierte Reproduktion relevant, sondern könnten auch in die Humanreproduktion übertragen werden. Die Frau weist eine ähnliche Ovarphysiologie auf wie die Stute, diese stellt somit ein ideales Modelltier für die humane IVF dar (Carnevale, 2008). Die guten Kenntnisse über die Morphologie der equinen Oozyte sowie die gute Etablierung von Techniken wie der ICSI stellen ein solides Fundament für weitere translationale Forschung.

Die reproduktionsmedizinischen Gemeinsamkeiten beider Spezies wurden schon von verschiedenen Autoren zusammengestellt (Parfenov et al., 1989; Hinrichs et al., 1993):

1. eine lange Follikelphase
2. ein langes interovulatorisches Intervall
3. die Präsenz eines dominanten Follikels im Östrus
4. die Formation eines grossen Follikels mit viel Follikelflüssigkeit
5. eine relativ lange Zeitspanne zwischen LH Stimulation und Ovulation (36h)
6. ein dichtes Chromatinnetzwerk im GV, wenn die Oozyte die meiotische Kompetenz erlangt, oder in Atresie geht

Über die Reproduktionsorgane hinaus hat die Stute auch weitere Ähnlichkeiten zum Menschen, sowohl in der Physiologie als auch in der Pathologie. Hierzu zählen beispielsweise die Einflüsse von Stress, sportlicher Aktivität, Obesitas oder Stoffwechselproblemen wie das metabolische Syndrom auf die Reproduktionsleistung. Auch die Langzeitwirkung von Medikamenten auf den Reproduktionstrakt kann beim Pferd bestens untersucht werden. Alle diese Merkmale machen die equine Oozyte zu einem optimalen Modell, um auch die humane Reproduktionsmedizin besser zu verstehen.

5. MATERIAL UND METHODEN

Das Probenmaterial für diese Arbeit bestand aus Kumulus-Oozytenkomplexen (KOK), welche aus Ovarien von zur Schlachtung vorgesehenen Stuten gewonnen wurden. Das Ziel dieser Arbeit war der Vergleich des Proteinmusters von Kumuluszellen nach erfolgreicher Maturation *in-vivo* und nach erfolgreicher Maturation *in-vitro*. Für jede Gruppe sollten zehn KOK für die Analyse gewonnen werden. Bei den Stuten der *in-vivo* Gruppe wurde vor der Schlachtung der Zyklus kontrolliert und im Östrus die Ovulation induziert. Die Tiere der *in-vitro* Gruppe wurden ohne vorherige Zykluskontrollen geschlachtet und die unreifen Oozyten der Maturation *in-vitro* zugeführt. In diesem Kapitel erfolgt die ausführliche Beschreibung der KOK Gewinnung und Aufarbeitung für die beiden Vergleichsgruppen.

5.1. *In-vivo* Gruppe

Die Probengewinnung für die in *in-vivo* Gruppe wurde im Zeitraum vom September 2013 bis Mai 2014 durchgeführt. Dafür wurden ausschliesslich Stuten verwendet, welche zur Schlachtung vorgesehen waren. Die Herkunftsländer der Stuten waren die Schweiz und Frankreich. Es wurden 16 Stuten in einem Alter zwischen 3 und 22 Jahren für das Projekt gekauft, welche entweder aus gesundheitlichen Gründen oder aufgrund ihres Alters geschlachtet wurden (Tabelle 1). Alle Stuten wurden bis zum Schlachtzeitpunkt in einem privaten Pferdezuchtbetrieb im Kanton Aargau untergebracht, wo sie in der Gruppe gehalten wurden und freien Weidegang hatten. Die Schlachtung wurde im Schlachtlokal vom Tierspital der Universität Zürich vom dortigen Metzger durchgeführt. Die geschlachteten Stuten waren alles Tiere, welche im Equidenpass als Nutztiere registriert waren. Das Fleisch konnte also für die Produktion von Lebensmitteln weiterverwendet werden. Für den Versuch lag eine Tierversuchsbewilligung vom Kantonalen Veterinäramt vor (Tierversuchsnummer 153/13).

Tabelle 1: Anamnestische Daten der Schlachtstuten der *in-vivo* Gruppe

ID	Rasse	Alter	Herkunft	Schlachtung	KOK's total	KOK's expandiert	Proteomik Auswertung
1KOK	Freiberger	9	CH	21.09.2013	1	1	-
2KOK	Warmblut	15	CH	28.09.2013	-	-	-
3KOK	Warmblut	27	CH	06.10.2013	-	-	-
4KOK	Freiberger	12	CH	23.09.2013	1	1	-
5KOK	Freiberger	21	CH	02.10.2013	-	-	-
6KOK	Warmblut	12	CH	06.10.2013	1	1	ja
7KOK	Warmblut	6	CH	16.10.2013	-	-	-
8KOK	Polen	9	CH	24.12.2013	1	1	ja
9KOK	Traber	4	F	10.04.2014	-	-	-
10KOK	Traber	3	F	12.04.2014	3	1	ja
11KOK	Vollblut	4	F	12.04.2014	2	1	ja
12KOK	Traber	6	F	14.04.2014	3	2	ja
13KOK	Traber	3	F	15.04.2014	-	-	-
14KOK	Traber	5	F	06.05.2014	5	1	ja
15KOK	Traber	3	F	10.05.2014	3	1	ja
16KOK	Traber	4	F	17.05.2014	-	-	-

ID: Identitätscode Probe.

5.1.2. Vorbereitung der Stuten

Der Sexualzyklus der Stuten wurde regelmässig mittels rektaler palpatorischer und ultrasonografischer Untersuchung kontrolliert. Dabei wurden die Ovarien auf Funktionsgebilde untersucht, und die Gebärmutter hinsichtlich eines vorhandenen Rosseödems beurteilt. Wiesen die Stuten einen Follikel mit einer Grösse von mindestens 35 mm zeitgleich mit einem uterinen Ödem auf, wurde intravenös 2500 I.E. hcG (Chorulon®, MSD Animal Health, Luzern) verabreicht, um die Maturation des Kumulus-Oozytenkomplexes zu induzieren. Exakt 30h später wurden die Stuten nach ultrasonografischer Kontrolle des Follikels geschlachtet.

Bei Stuten, die bei erstmaliger Untersuchung keine Rosseanzeichen zeigten, wurde intramuskulär 1 ml Cloprostenol (Estrumate®, Veterinaria, Pfäffikon) verabreicht, um die Luteolyse herbeizuführen und somit eine Rosse zu induzieren.

Der Zeitpunkt der Verabreichung von Chorulon® (MSD Animal Health, Luzern) wurde auf morgens 5.00 Uhr gelegt, damit die Schlachtung am darauf folgenden Tag um 11.00 Uhr durchgeführt werden konnte.

5.1.3. Oozytengewinnung

Die Stuten wurden im Schlachtlokal mit einem Bolzenschussapparat betäubt und sofort entblutet. Nach 2 min. wurde die Bauchhöhle eröffnet, um die Ovarien zu entnehmen. Die Ovarien wurden in 38 °C warme physiologische Kochsalzlösung (s. Medienverzeichnis Nr. 9.2.3) mit Heparin (9.2.4) und Antibiose (9.2.6) verbracht und in einem Thermobehälter (9.1.7) warm gehalten bis sie im IVF Labor der Klinik für Reproduktionsmedizin am Tierspital Zürich weiter verarbeitet wurden. Die Zeit von der Schlachtung bis zur Bearbeitung im Labor betrug ca. 15 min. Dort wurde der Follikel mit einem Skalpell (9.1.10) über einer Wärmeplatte (38°C) aufgeschnitten. Die Follikelflüssigkeit wurde aufgefangen. Das Follikellumen wurde mit einem scharfen Löffel ausgekratzt und mit einer DMEM Hepes (9.2.1) gefüllten 20 ml Spritze (9.1.9) dreimal ausgespült. Die Flüssigkeit wurde dann unter dem Mikroskop (9.1.6) auf einen Kumulus-Oozyten-Komplex durchsucht. Von 9 Stuten konnte je ein KOK isoliert werden, von einer Stute (ID 12; 12KOK) konnten zwei KOK von zwei verschiedenen Follikeln gewonnen werden (Tabelle 1). Von 7 Stuten konnte kein KOK gewonnen werden, dies entspricht einer Findungsrate von 62.5 %. Aus der Stute 12KOK konnten zwei KOK aus zwei Follikeln gewonnen werden, beide wurden mittels MS analysiert, in die finale Auswertung wurde ein KOK (12KOKA) aufgrund einer besseren Intensität mit geringerem Normalisationsfaktor in der MS Analyse übernommen. 1KOK und 4KOK wurden im Rahmen von Vorversuchen noch in PBS und nicht in DMEM gewonnen und wurden darum nicht in die finale Auswertung übernommen. Somit wurden für die *in-vivo* Gruppe final die MS Daten von 7 KOK ausgewertet (Tabelle 1).

Die Aufbereitung der KOK für die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte nach folgendem Protokoll (9.3):

Der KOK wurde in Waschtropfen aus PBS (9.2.5) gewaschen und danach in seiner weitesten Länge unter dem Mikroskop (9.1.6) in einer 40-fachen Vergrößerung gemessen. Der Kumuluskomplex wurde mit Hilfe einer Stripperpipette (9.1.15), justiert auf 3 µl, von der Oocyte getrennt. Ein Volumen von 3 µl Kumuluszellen in PBS wurde in ein 1.5 ml Eppendorf Röhrchen (9.1.4) mit 7µl Trypsin (9.2.7) gegeben. Das Röhrchen wurde 10 min. bei 37 °C inkubiert und zur Herstellung einer homogenen Kumulussuspension 4-mal mit der Stripperpipette durchmischt. An einem Aliquot von 1µl Kumulus Suspension wurde eine Bestimmung von Zelldichte und Vitalität der Kumuluszellen mit Hilfe der Trypan Blau Färbung (9.2.12) durchgeführt. Das Aliquot wurde in 4µl Trypanblau Lösung gelöst und für 3 min. inkubiert, um die toten Kumuluszellen blau anzufärben. Die restlichen 9µl Kumulus Suspension wurden unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die angefärbten Kumuluszellen wurden in einer Neubauerzählkammer (9.1.16) ausgezählt. Dabei wurde zwischen grossen weissen, kleinen weissen (vitalen), und grossen blauen (toten) Kumuluszellen unterschieden.

Die von den Kumuluszellen getrennte Oocyte wurde für 5 min. in einen weiteren Tropfen 20%iger Trypsinlösung verbracht, um die letzten verbliebenen Kumuluszellen von der Oocyte zu trennen. Anschliessend wurde unter dem inversen Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung

kontrolliert, ob ein Polkörper ausgestossen wurde und somit eine erfolgreiche Maturation stattgefunden hatte (Abb. 2). Nur die Proben, bei denen ein Polkörper identifiziert werden konnte, wurden für die Proteomik Analyse weiterverwendet.

Die Oozyten wurden anschließend zur Beurteilung des Chromatinmusters mit Höchst® (9.2.9) angefärbt. Dafür wurden sie zuerst für 15 min. in einem 100µl Tropfen aus Formalin (9.2.12) eingelegt, um fixiert zu werden. Anschliessend wurden sie auf einem Objektträger mit 6µl Höchst Lösung (9.2.9) platziert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung konnte jedoch nur bei einzelnen Oozyten erfolgreich durchgeführt werden. Auf eine detaillierte Analyse der Bilder wurde aufgrund dessen verzichtet. Exemplarisch zeigt Abb. 3 eine Metaphase II Oocyte, bei der die DNA im Polkörper wie auch im Zytoplasma schön zu erkennen ist.



Abb. 2: Metaphase II Oocyte mit Polkörper (schwarzer Pfeil), und Kumuluszelle (roter Pfeil). Schwarzer Balken = 50µm,

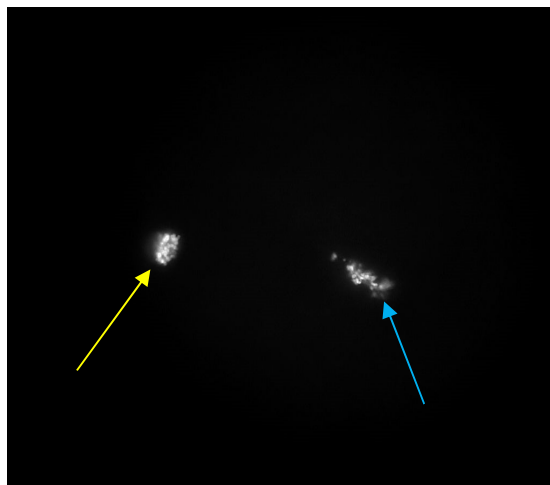


Abb. 3: Höchst Färbung einer Metaphase II Oozyte mit Polkörper (gelber Pfeil) und Metaphase II Platte (blauer Pfeil).

5.1.4. Charakterisierung der *in-vivo* gereiften KOK

Die Follikelflüssigkeit von den *in-vivo* gereiften Oozyten stellte einen limitierenden Faktor auf der Suche nach KOK unter dem Mikroskop dar. Der visköse Inhalt der sprungreifen Follikel hat eine eidotterähnliche Konsistenz, was zu einem starken Verklumpen führte (Abb. 4 und 5). Dieser Faktor erschwerte die Suche nach KOK massgeblich und resultierte in einer reduzierten Oozytengewinnungsrate von 62.5%. Bei der Charakterisierung der KOK wurde deshalb auch die Zeit vom Start der Follikelspülung bis ein KOK gefunden wurde berücksichtigt. Diese Zeitspanne variierte von 0.5 h – 2 h. Insgesamt wurden acht KOK charakterisiert (Tabelle 2). Wie weiter oben schon erwähnt, wurden der größte Durchmesser der KOK unter dem inversen Mikroskop (9.1.6) bei 40-facher Vergrößerung bestimmt. Die Qualität des Kumulus wurde in expandiert oder kompakt eingeteilt (Abb. 6). Auch für das Ovar und den Follikel, aus dem der jeweilige KOK stammte, wurde der maximale Durchmesser bestimmt. Blutungen in die gewonnene Follikelflüssigkeit wurden mit Erythrozyten (EC's) + oder – bezeichnet.

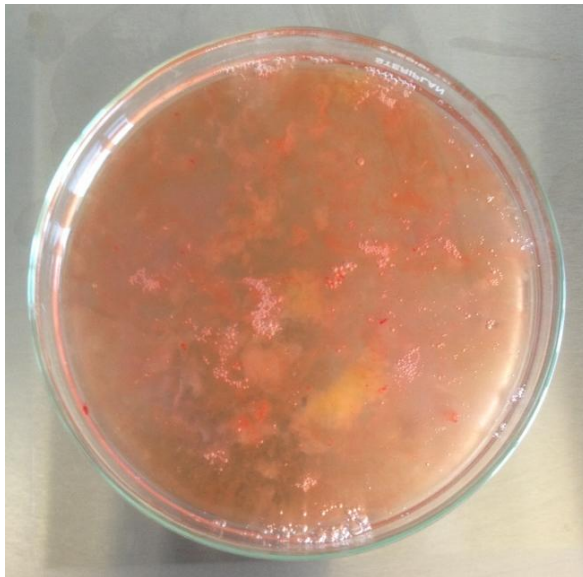


Abb. 4: Inhalt eines sprungreifen Follikels in einer Petrischale.

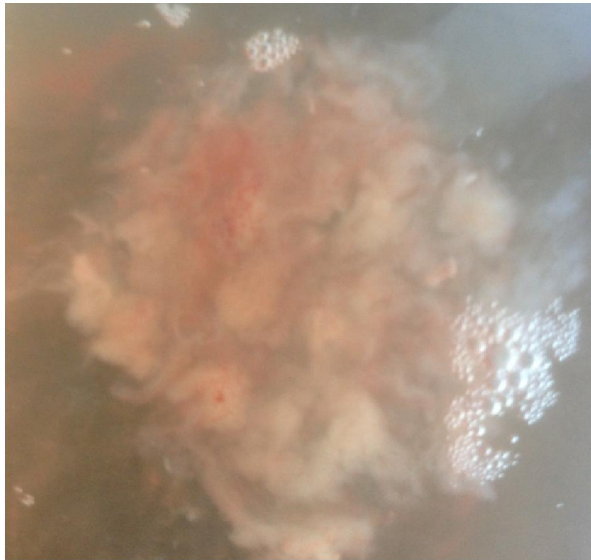


Abb. 5: Eidotterähnlicher, schleimiger Zelldetritus aus dem Follikellumen eines sprungreifen Follikels.



Abb. 6: Oozyte mit Corona radiata Zellen (Pfeil), und expandiertem Kumulus. Schwarzer Balken = 500µm.

Tabelle 2: Charakterisierung der *in-vivo* maturierten Oozyten

ID	T°C	Ovar cm	Follikel cm	KOK µm	Kumulus		EC	Eizelle	Zählkammer		
					Menge	Qualität			gw	kw	gb
6KOK	36.8	7.0	3.6	2553.13	viel	e	+	cr/p	26	15	0
8KOK	37.8	7.0	4.2	2644	mittel	e	+	cr/p	19	2	0
10KOK	38	6.0	4	3387.7	viel	e	-	cr/p	26	6	4
11KOK	37.9	7.0	3.8	1645.8	wenig	e	-	cr/p	21	3	0
12KOKA	36.9	9.0	4.8	2939.9	viel	e	-	cr/p	46	4	24
12KOKB	35.1	7.1	3.9	2004	viel	e	-	cr/p	19	37	3
14KOK	35.1	8.2	4.2	2460	viel	e	-	cr/p	41	11	7
15KOK	36.2	7.5	4.5	2894.4	viel	e	-	cr/p	36	4	5

ID: Identifikationscode Proben, KOK µm: längster Durchmesser unter dem Mikroskop in 40-facher Vergrösserung, e: expandiert, Ec: Erythrozyten, cr: Corona radiata, p: Polkörper, gw: grosse weisse, kw: kleine weisse, gb: grosse blaue.

5.2. *In-vitro* Gruppe

Für die *in-vitro* Studie wurden Ovarien aus den Pferdeschlachtbetrieben Michel (Felben, ZH, Schweiz) und Baumgartner (Diepoldsau, SG, Schweiz) verwendet. Die Stuten wurden dort unabhängig von ihrem Sexualzyklus geschlachtet. Die Stuten wurden immer am Montagmorgen zwischen 7 und 10 Uhr geschlachtet. Es wurden KOK aus Ovarien von 5 verschiedenen Stuten untersucht (Tabelle 3). Die Ovarien wurden nach dem Schlachten in 38°C warme physiologische Kochsalzlösung (9.2.3) verbracht. Die Zeit von der Schlachtung der Stuten bis die Ovarien im Labor weiterverarbeitet wurden, betrug im Durchschnitt 3 Stunden. Dies ist auf die geographische Distanz vom Labor und den Schlachtbetrieben zurückzuführen.

Tabelle 3: Anamnestische Daten der Schlachtstuten der *in-vitro* Gruppe

ID	Rasse	Alter	Herkunft	Schlachtdatum	KOK's total	KOK's maturiert
34KOKV	Warmblut	18	CH	26.08.2014	3	2
36KOKV						
38KOKV	Warmblut	22	CH	01.09.2014	2	1
39KOKV	Traber	2	CH	01.09.2014	2	2
40KOKV						
41KOKV	Freiberger	17	CH	08.09.2014	5	2
42KOKV						
43KOKV	Freiberger	9	CH	08.09.2014	1	1

ID: Identitätscode der Proben, KOK total: gewonnene KOK vor der Maturation alle mit kompaktem Kumulus, KOK maturiert: KOK mit Polkörperchen nach 30h Maturation. Die Maturationsrate beträgt 62%.

5.2.1. *In-vitro* Maturation

Im Labor wurden dann alle Follikelstadien, die auf den Ovarien gefunden wurden, mit einem Skalpell (9.1.10) aufgeschnitten und wie bei den *in-vivo* Follikeln mit DMEM Hepes (9.2.1) ausgespült, die Grösse gemessen und mit einer Follikel ID gekennzeichnet. Für die *in-vitro* Maturation wurden nur unreife KOK mit kompaktem Kumulus selektiert (Abb. 8). Das ausführliche Protokoll findet sich im Anhang (9.3).

Alle gefundenen KOK wurden in einer 60 mm Petrischale in DMEM Advanced (9.2.2) gewaschen, um anschliessend in die Maturationstropfen verbracht zu werden. Diese bestanden aus 975µl DMEM Advanced+Hormone (9.2.2, 9.2.8). Die Wasch- und Maturationstropfen wurden 1h vor dem Gebrauch bei 38.5 °C und 5% CO₂ präinkubiert. Die KOK wurden schliesslich für 30h (9.1.5) bei 38.5 °C, und 5% CO₂ im Inkubator *in-vitro* maturiert. Nach Ablauf der 30h wurden alle KOK in DMEM Hepes (9.2.1) bei Raumluft auf eine Wärmeplatte gegeben. Anschliessend wurde nach dem gleichen Protokoll wie in Gruppe 1 weitergearbeitet (9.3).

5.2.2. Charakterisierung der *in-vitro* gereiften KOK

Im Vergleich zu den sprungreifen Graafischen Follikeln aus der *in-vivo* Gruppe zeigte die Follikelflüssigkeit aus den Sekundär- oder Tertiärfollikel aus der *in-vitro* Studie eine kaum visköse/wässrige Konsistenz (Abb. 7). Die Charakterisierung erfolgte analog zur *in-vivo* Gruppe (Tabelle 4). Die Qualität des Kumulus wurde vor und nach der Maturation beurteilt. Für die *in-vitro* Maturation wurden nur KOK mit einem kompakten Kumulus oophorus selektiert (Abb. 8). Die Probenaufarbeitung nach 30 h Maturation erfolgte analog zur *in-vivo* Gruppe. Die Maturationsrate betrug 62%. Die maturierten Oozyten hatten alle einen Polkörper (Abb. 9).

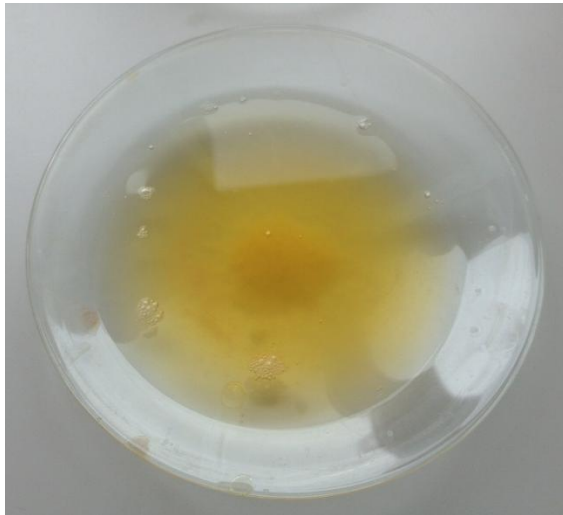


Abb. 7: Follikelflüssigkeit eines unreifen Follikels, mit einem Durchmesser von 3cm.

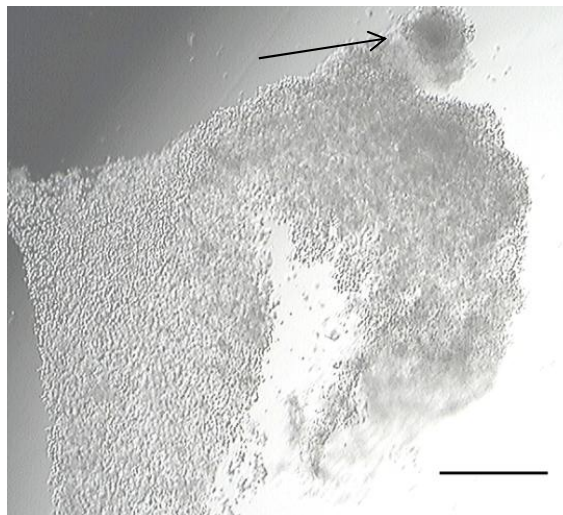


Abb. 8: Oocyte mit Corona Radiata (Pfeil) und kompaktem Kumulus. Schwarzer Balken = 500µm.



Abb. 9: *In-vitro* maturierte Oozyte mit Polkörper. Schwarzer Balken = 50μm.

Tabelle 4: Charakterisierung der *in-vitro* maturierten Oozyten

ID	T°C	Ovar		Follikel cm	KOK μm	Kumulus				Eizelle	Zählkammer		
		cm	GK			Menge	Qualität		EC		gw	kw	gb
34KOKV	23	8.0	-	3.5	2390.4	viel	k	e	-	cr/p	41	1	6
36KOKV	29	8.0	-	3	2145.8	viel	k	e	-	cr/p	32	3	5
38KOKV	30	4.0	-	<2	2615.4	viel	k	e	-	cr/p	83	1	3
39KOKV	34	5.0	-	3.5	1001.9	mittel	k	e	-	cr/p	43	0	1
40KOKV	26	5.0	-	4	2995	viel	k	e	-	cr/p	184	6	5
41KOKV	28	8.0	-	4.5	1783.6	viel	k	e	-	cr/p	155	6	2
42KOKV	22	4.0	-	3.5	673.2	wenig	k	e	-	cr/p	16	0	0
43KOKV	31	4.0	GK	2	328.1	wenig	k	e	-	cr/p	4	0	0

ID: Identifikationscode Proben, GK: Gelbkörper, KOK μm: längster Durchmesser unter dem Mikroskop in 40-facher Vergrösserung, e: expandiert, k: kompakt, Ec: Erythrozyten, cr: Corona radiata, p: Polkörper, gw: grosse weisse, kw: kleine weisse, gb: grosse blaue.

5.3. Messung der Proben am Functional Genomic Center

5.3.1. Probenvorbereitung

Bis zum Zeitpunkt der Analyse wurden die Proben bei -80°C im Tiefgefrierschrank gelagert. Eine Kombination von Sonoreaktor (SR) basierender Zelllyse (Lopez-Ferrer et al., 2005) und der Probenvorbereitung durch eine „filter aided sample preparation“ (FASP) (Wisniewski et al., 2009) wurde für die Proteinextraktion und Verdauung verwendet (SR-FASP). Das SR-FASP Protokoll wurde speziell vom Functional Genomic Center in Zürich für die Vorbereitung der sehr kleinen Probenmengen von einzelnen KOK entwickelt. Zuerst wurde die Metabolitenextraktion mit vier Gefrier- und Auftauzyklen in 90%-igem Methanol

durchgeführt. Nach 15 min. Zentrifugation wurde das gewonnene Pellet wieder bei -80°C tiefgefroren bis die eigentliche Proteomik Analyse durchgeführt wurde. Der Überstand wurde für eine Metabolomics Untersuchung aufbewahrt.

Das Pellet wurde in 30µl SDS Lysepuffer (9.2.13) gelöst und für 5 min. bei 95 °C inkubiert. Danach wurden die Proben mit einem High Intensity Focused Ultrasound (9.1.17) für 10 min. mit einer Ultraschallamplitude von 65% und einem Zyklus von 0.5 beschallt (Lopez-Ferrer et al., 2005). Anschliessend wurden die Proben für 10 min. bei 14000xg zentrifugiert und die Proteinkonzentration mit dem Qubit® Protein Assay Kit (9.1.18) bestimmt. Unter Verwendung des adaptierten filterunterstützten Protokolls (FASP) wurden 10µg Protein verdaut (Wisniewski et al., 2009). Dazu wurden die Proteine mit 200µl UT Puffer (9.2.14) verdünnt und auf einen Microcon-30kDa Zentrifugenfilter mit einer Ultracel-30 Membran geladen (9.1.19). Dieser wurde für 25 min. bei 14'000 G bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Filtereinheit wurde mit 200µl UT Puffer (9.2.14) gewaschen und es folgte eine weitere Zentrifugation für 25 min. bei 14'000xg. Die Alkylierung der reduzierten Proteine wurde mit 0,05 M Iodoacetamid in 100µl UT Puffer (9.2.14) durchgeführt, welches für 5 min. auf dem Filter inkubiert wurde. Darauf folgten 3 Waschzyklen mit 100µl UT und zwei Waschzyklen mit 100µl NaCl 0.5 M. Der proteolytische Verdau wurde mit Hilfe von Trypsin (9.2.7) über Nacht durchgeführt. Dazu wurde Trypsin in einem Verhältnis von 1:50 (Trypsin/Protein) in 120 µl 0.05 M Triethylammonium-bicarbonat Puffer (pH 8.5) auf die Filtereinheit gegeben und die Proben bei Raumtemperatur (RT) in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach der Elution bei 14'000xg bei RT wurde die Peptidlösung mit Trifluoroessigsäure (TFA) bis zu einer finalen Konzentration von 0.5% angesäuert. Die Peptide wurden für die MS Analyse mit Festphasenextraktionssäulen C18 entsalzt, nachfolgend in einem Vakuumkonzentrator getrocknet und in LC-MS Lösung resolubisiert.

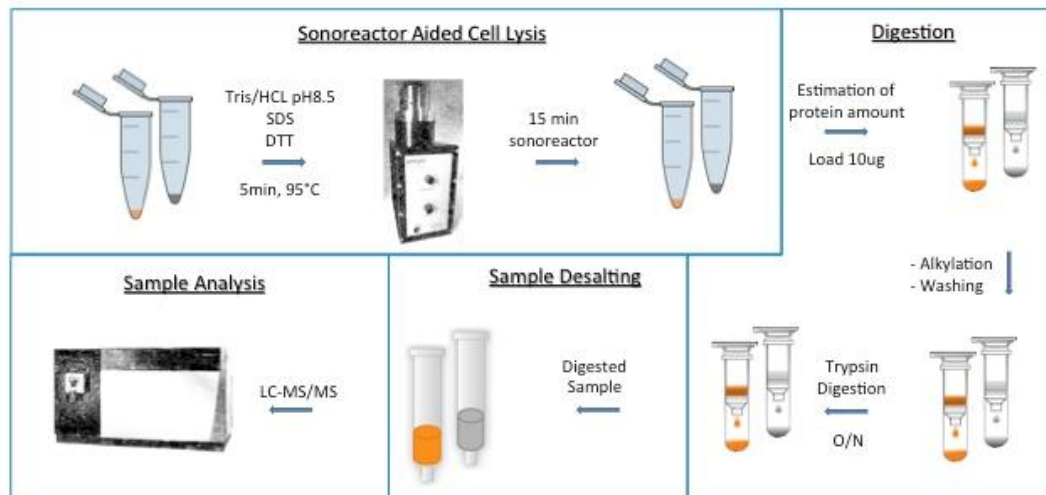


Abb. 10: Ablauf der Probenaufarbeitung: Nach einer Sonoreaktor assistierten Zelllyse und Proteinextraktion wurden 10µg Protein jeder Probe gewaschen, reduziert, alkalisiert und über Nacht mit Trypsin verdaut. Die Proben wurden dann mittels LC-MS/MS im datenabhängigen Aquisitionsmodus gemessen.

5.3.2. Massenspektrometrie

Die Proben wurden in einem Block in zufälliger Reihenfolge analysiert. Verwendung fand ein LC-MS/MS Orbitrap Fusion Massenspektrometer (9.1.20) mit datenabhängigem Aufnahmefokus. Das MS wurde an ein Nano HPLC System gekoppelt (9.1.21). Die Peptide wurden auf einer selbstgefertigten Kapillarsäule (75µm x 150mm), die mit „reverse phase“ Säulenmaterial gefüllt wurde, gegeben. Das Nanospray wurde durch die Kopplung mit einem Glasemitter erreicht. Die Flüssigkeitszusammensetzung für Kanal A war 0.1 % Ameisensäure in Wasser und 0.1 % Ameisensäure in Acetonitril für Kanal B. Die Peptide wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 300 nl/min. bei einem Gradienten von 1% bis 35% Acetonitril über 120 min. eluiert. Nachfolgend wurde die Säule durch eine Erhöhung des Acetonitrilsanteils auf 98% für 10 min gewaschen. Die Precursormassenspektren (300-1500 m/z) wurden bei einer Auflösung von 60'000 bei 200 m/z und einem Ionenzielwert von 5×10^5 aufgenommen. Eine interne Massenkalkulation (371,1010 und 445,12003 m/z) wurde gebraucht und die maximale Zyklusdauer zwischen den Vorläuferionenmassenspektren war auf 3 Sekunden eingestellt. Datenabhängige MS/MS wurden in der linearen Ionenfalle aufgezeichnet. Als Massenselektor wurde der Quadrupol mit einem Fenster von 0.7 Da verwendet. Selektierte Ionen wurden durch HCD Fragmentation mit 30% Kollisionsenergie fragmentiert. Die Massenanalyse in der Ionenfalle wurde im schnellen Scanverfahren mit einem Ionenzielwert von 1×10^4 und einer maximalen Injektionszeit von 35 ms durchgeführt. Vorläufersignale mit einem Ladungszustand von +2 bis +6 wurden für die Fragmentation selektiert, wenn sie mindestens eine Signalintensität von 1×10^4 aufwiesen. Diese Signale wurden dann während 25 Sekunden eine dynamische Ausschlussliste gesetzt. Ein Pool von 5µl von jeder Probe

wurde im gleichen Analyseblock analysiert und als Referenz für die Retentionszeitnormalisierung benutzt.

5.3.3. Datenanalyse

Die Progenesis QI Proteomics Software wurde für die labelfreie Quantifizierung verwendet. Es wurde eine paarweise automatische Angleichung jeder Messung an die Referenz aus dem Probenpool durchgeführt. Das Peak Picking wurde mit hoher Sensitivität durchgeführt und es wurden nur Ionen mit den Ladungen 2, 3 und 4 für die Analyse verwendet. Die besten fünf Tandemmassenspektren (Rangierung entspricht der Entfernung vom Apex des Elutionsprofiles) pro Peptid-Ion wurden mit Ladungsdekonvolution und Deisotopisierung mit einer maximalen Fragmentationszahl von 200 peaks pro MS/MS exportiert (Kall et al., 2008). Die Spektren wurden in der Uniprot Datenbank für Pferde (NCBI Taxonomy ID 9796, release date 20141121) durchsucht, welche zur genaueren Beschreibung von nicht charakterisierten Proteinen bei der Spezies *Equus caballus* mit homologen Proteinen anderer Spezies in der Uniprot Datenbank verknüpft wurde. Zur Abschätzung der Fehlerrate bei der Proteinidentifikation wurden zusätzlich reverse Sequenzinformationen verknüpft. Die Suche erfolgte auf dem Mascot Server v.2.4.3 (Matrix Science, UK) mit einer Toleranz von 10 ppm für Vorläuferionenmassen und 0.5 Dalton für Fragmentionentoleranz. Die Enzymspezifität wurde für Trypsin eingestellt mit einem erlaubten Maximum von zwei fehlenden Spaltstellen. Die Karbamidomethylierung von Cystein wurde als eine feste Modifikation gesetzt, die Oxidation von Methionin, die Deaminierung von Glutamin und Asparagin und die Acetylierung des Protein N-Terminus wurden als variable Modifikationen ausgewählt. Das Suchergebnis von Mascot wurde in die Software Scaffold v.4.1.1. geladen, um die Peptidwahrscheinlichkeiten mittels des Peptid Prophet Algorithmus zuzuordnen. Proteine, welche identische Peptide hatten und nicht alleine mittels MS/MS Analyse differenziert werden konnten, wurden gruppiert, um dem Sparsamkeits-Prinzip Rechnung zu tragen. Die Peptid- und Proteinzuordnungen wurden nach FDR („false discovery rate“) Filtration exportiert (Peptid-Level 5%; Protein-Level 10%). Dieser Spektrenkatalog wurde in die Progenesis QI Software für Proteomik Analysen geladen, um die LCMS Intensitätseigenschaften mit der Peptid- und Proteininformation zu verbinden. Eine Probe aus der *in-vitro* maturierten Gruppe (43KOKV) wurde als starker Ausreisser identifiziert und von der finalen Auswertung ausgeschlossen. Somit wurde der Gruppenvergleich mit jeweils 7 Proben pro Gruppe durchgeführt. Das vollständig detektierte Kumulusproteom wurde mit Hilfe des PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) Klassifikationssystems den verschiedenen Gene Ontology Gruppen zugeteilt (<http://www.pantherdb.org>). Die zwei Experimentgruppen *in-vivo* und *in-vitro* (jeweils n=7) wurden miteinander verglichen. Nur Proteine mit mindestens 2 identifizierten Peptidsignalen wurden in der quantitativen statistischen Analyse ausgewertet. Die FDR für die quantifizierbaren Proteine lag unter 1% (Kall et al., 2008). Unterschiedlich exprimierte Proteine wurden mit einem fold change > 2 und mit $p \leq 0.05$ (t-Test) definiert. Mit Hilfe der String-Datenbank (<http://string-db.org>) wurde die Überrepräsentationsanalyse der

unterschiedlich exprimierten Proteine durchgeführt. Über- und unterexprimierte Proteine wurden über alle detektierten Proteine im Experiment gelegt und hinsichtlich einer Überrepräsentation von Gene Ontology Gruppen und KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Pathways analysiert.

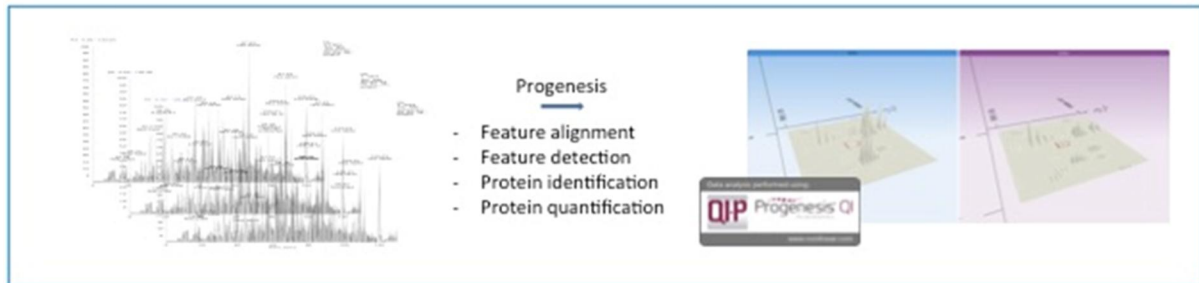


Abb. 11: Die erfassten Daten wurden mit Hilfe der Progenesis QI Software (Nonlinear Dynamics) ausgewertet. Nach dem Angleichen der Spektren an die Referenzprobe erfolgt das „Peak Picking“ unter dem mehrere Schritte zusammengefasst sind: Die Aggregation der Läufe, der Chromatogramm Aufbau, die Dekonvolution der Isotope und Addukte und letztlich die Normalisierung und Quantifizierung der Proteine. Die Proteinidentifikation erfolgte mit Hilfe einer Mascot Suche.

5.4. Zusammenarbeit mit anderen Instituten

Am Zustandekommen der vorliegenden Arbeit waren neben der Klinik für Reproduktionsmedizin am Departement für Nutztiere der Vetsuisse-Fakultät die folgenden Institutionen der Universität Zürich beteiligt:

Functional Genomics Center Zürich, Universität Zürich und ETH Zürich:

Proteomik Analyse und Datenauswertung (Dr. Bernd Roschitzki, Claudia Fortes, Dr. Jonas Grossmann).

5.5. Tierversuchsbewilligung

Für die Untersuchung lag eine Tierversuchsbewilligung des Kantonalen Veterinäramts Zürich vor (Tierversuchsnummer 153/13).

6. RESULTATE

6.1. Das Equine Kumulus Proteom

Im ganzen Versuchsansatz wurden insgesamt 2060 quantifizierbare Proteine aus der Uniprot Datenbank für Pferde nachgewiesen. Mit Hilfe des webbasierten Klassifikationssystems PANTHER (Mi et al., 2017) wurde die Verteilung der Proteine auf die verschiedenen Zellkomponenten analysiert.

In der Gene Ontology Einteilung nach zellularen Komponenten waren die Proteine auf acht Gruppen verteilt (Abb. 12). Die meisten Treffer ergaben die Komponenten Zellanteile mit 34% und Organellenproteine mit 22.3%. Proteine aus dem extrazellulären Bereich stellten die Minderheit dar (extracellular region 3.7%, extracellular matrix 0.8%).

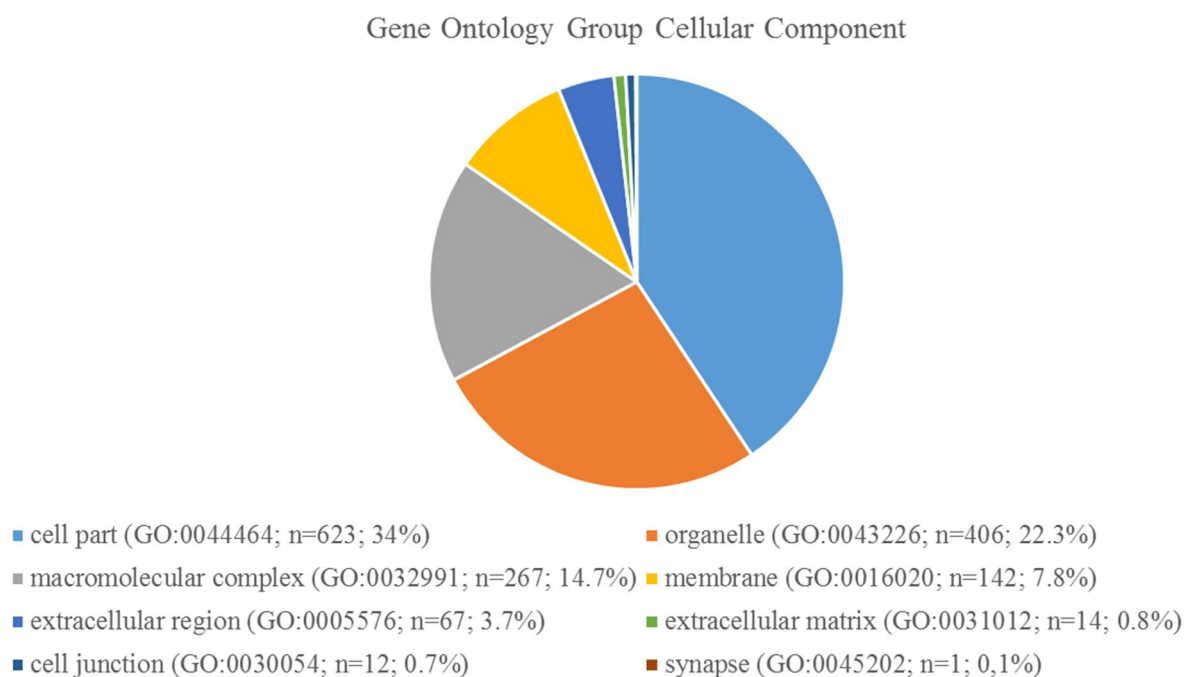


Abb. 12: Gene Ontology Group Cellular Component mit seinen acht Proteingruppen. Es wurden 1820 Gene detektiert, welche 1532 Komponententreffer ergaben. In jeder Komponentengruppe ist „n“ die Anzahl der Gentreffer aus dem Kumulusproteom. Die Prozentzahl gibt den Anteil der Gentreffer der jeweiligen Gruppe an allen detektierten Genen wieder.

Von den 2060 Proteinen waren 248 Proteine (12%) signifikant unterschiedlich exprimiert ($p < 0.05$, fold change > 2). Davon waren 104 Proteine (5%) in der *in-vivo* Gruppe und 144 Proteine (7%) in der *in-vitro* Gruppe signifikant hochreguliert. Die vollständige Tabelle der der signifikant unterschiedlichen Proteine findet sich im Anhang (Kapitel 11.4). Für die Beschreibung der Ergebnisse und der anschließenden Diskussion wurde eine Auswahl von

biologisch interessanten Proteinen bzw. Proteingruppen getroffen, welche entweder in der *in-vivo* oder in der *in-vitro* Gruppe signifikant erhöht waren.

6.2. *In-vivo* hochregulierte Proteine

6.2.1. Proteine der Komplement- und Koagulationskaskade

Von den 104 *in-vivo* hochregulierten Proteinen wurde eine Analyse auf überrepräsentierte Stoffwechselfade durchgeführt. Die Liste der 104 Proteine wurde dabei um Uniprot Accessions gekürzt, die auf homologe Proteine verwiesen. Somit wurden 95 Proteine in die Datenbank eingegeben. Von diesen fand sich für neun Proteine keine Übereinstimmung der „Protein Accession Number“ in der String Datenbank. So gab es 86 Treffer, welche für die Analyse genutzt werden konnten (Abb. 13). Mit Hilfe der Überrepräsentationsanalyse in der STRING Datenbank (STRING DB; <http://string-db.org>) wurde mit der Komplement- und Koagulationskaskade (Pathway ID 4610) ein signifikant überrepräsentierter biologisch interessanter KEGG Stoffwechselweg identifiziert ($n=22$; $p=9.3e^{-21}$). Aufgrund dieser hochsignifikanten Überrepräsentation fokussiert sich die Diskussion der vorliegenden Arbeit insbesondere auf die Proteine aus diesem Stoffwechselweg.

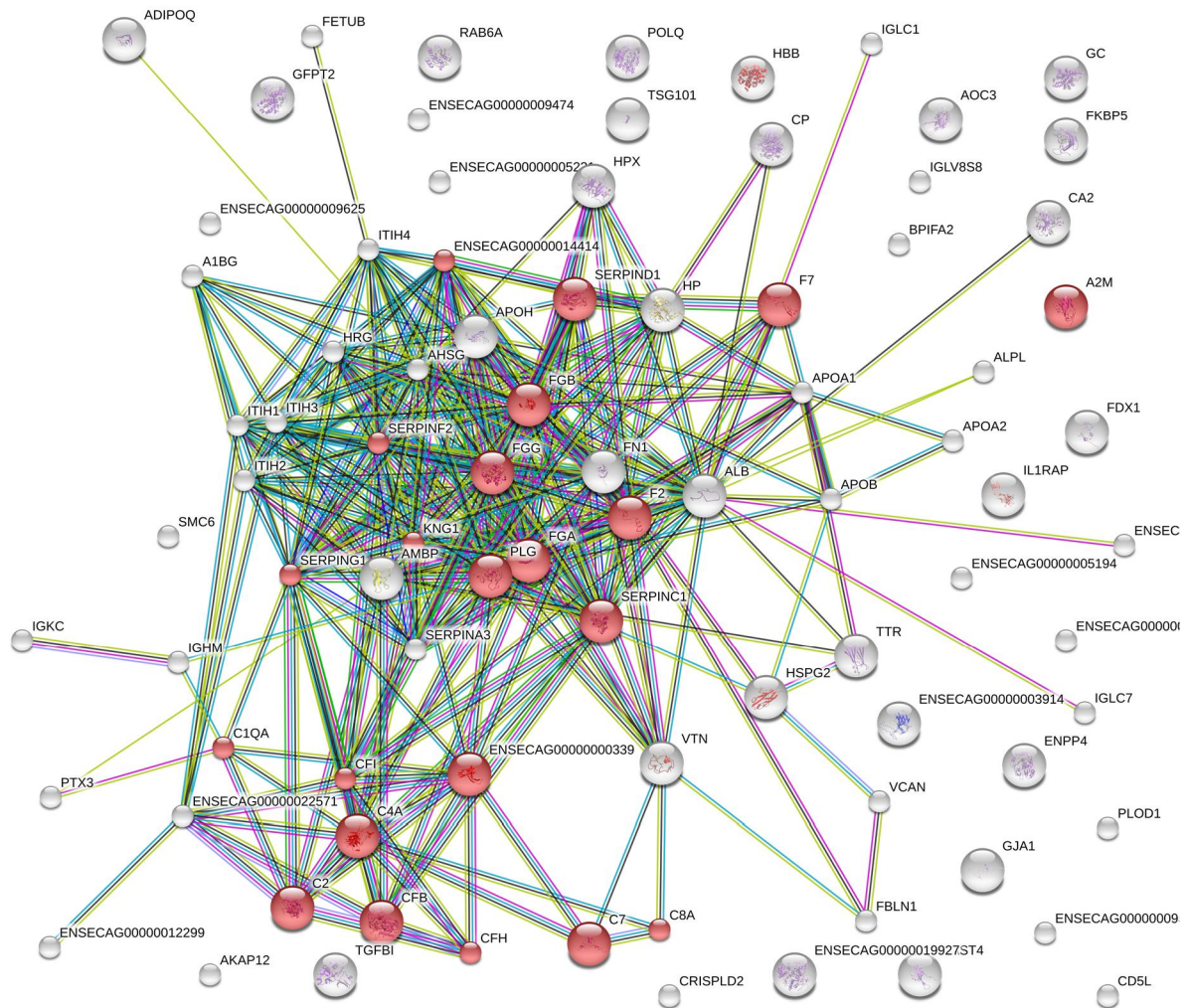


Abb. 13: Interaktionsnetzwerk der *in-vivo* hochregulierten Proteine erstellt mit Hilfe der STRING DB (Interaktionswert: mittlere Konfidenz (0.4)). Fünfundneunzig Proteine wurden in die Datenbank eingegeben; bei 9 Proteinen gab es keine Übereinstimmung der „Protein Accession Number“ mit der Datenbank, so dass nur 86 abgebildet sind. Die KEGG Anreicherungsanalyse ergab, dass der Stoffwechselweg Komplement und Koagulationskaskade (Pathway ID 4610) mit 22 Genen in der Gruppe der *in-vivo* hochregulierten Proteine signifikant überrepräsentiert ist ($p=9.3e^{-21}$). Als Hintergrund für die Analyse wurden die 2060 quantifizierbaren Proteine aus dem Versuch genutzt.

Die KEGG Überrepräsentationsanalyse in der String Datenbank ergab, dass der Stoffwechselweg Komplement und Koagulationskaskade (Pathway ID 4610) mit 22 beobachteten Genen signifikant überrepräsentiert ist ($p=9.3e^{-21}$). Als Hintergrund für die Analyse wurden die 2060 quantifizierbaren Proteine aus dem Versuch genutzt (Abb. 14, Tabelle 5). Die Proteine des Komplementsystems stellen einen wesentlichen Teil des innate Immunsystems dar, und spielen eine wichtige Rolle beim Ovulationsprozess. Dies wird im Kapitel 7.1.2. der Diskussion näher beschrieben.

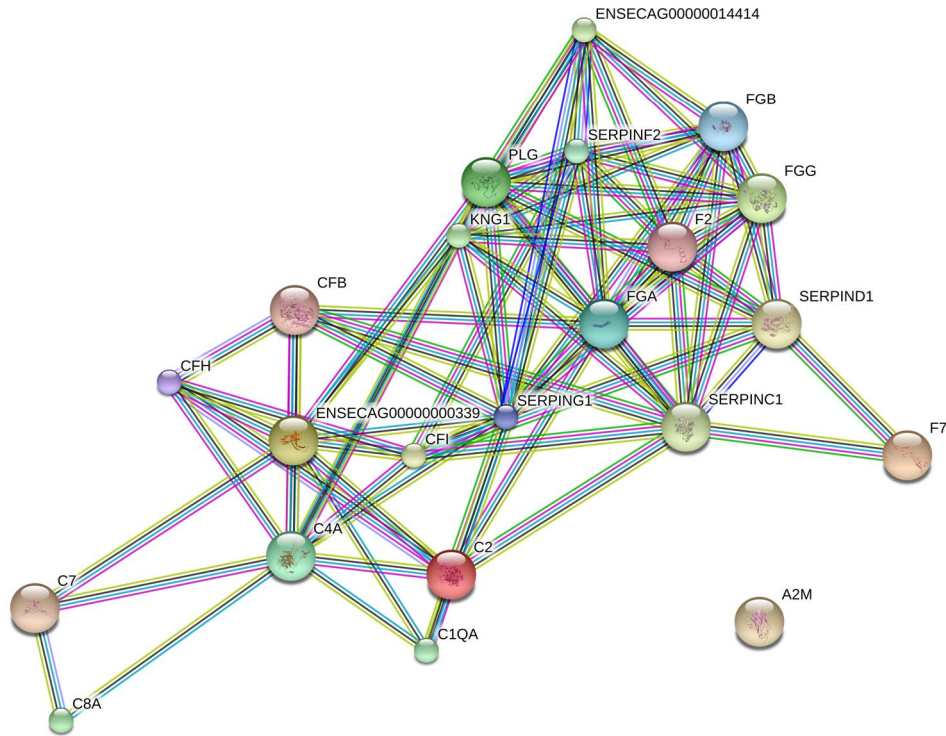


Abb. 14: Interaktionsnetzwerk der 22 Proteine aus der biologischen Gruppe Komplement und Koagulationskaskade (KKK) erstellt mit Hilfe der STRING DB (Interaktionswert: mittlere Konfidenz (0.4)). Die KEGG Anreicherungsanalyse ergab, dass der Stoffwechselweg Komplement und Koagulationskaskade (Pathway ID 4610) mit 22 Genen in der Gruppe der *in-vivo* hochregulierten Proteine signifikant überrepräsentiert ist ($p=9.3e^{-21}$). Als Hintergrund für die Analyse wurden die 2060 quantifizierbaren Proteine aus dem Versuch genutzt.

Tabelle 5: *In-vivo* signifikant hochregulierte Proteine aus dem KEGG Stoffwechselweg Komplement- und Koagulationskaskade

Uniprot ID	Homologe Proteinbeschreibung	fold change	Peptidanzahl	Confidence score	Mittelwert ± Stabw.		p-Wert
					<i>in-vivo</i>	<i>in-vitro</i>	
Komplement							
F6RI47_HORSE	A2MG_HUMAN Alpha-2- macroglobulin	35,4	104	103	18.8 ± 1.7	15.9 ± 0.1	0,000
F7CSL8_HORSE	A1AT2_HORSE Alpha-1- antiproteinase 2	7,5	36	35,8	16.3 ± 1.5	1453 ± 0.9	0,020
F6RMD0_HORSE	CFAB_HUMAN Complement factor B	15,9	29	28,8	15.1 ± 1.5	13.1 ± 0.5	0,006
F6ZR63_HORSE (F7E3H8_HORSE)	CFAH_HUMAN Complement factor H	12,6	31	30,7	8.6 ± 4.1	3.8 ± 3.5	0,032
F7AU56_HORSE	CFAI_PONAB Complement factor I	17,4	5	4,9	13.7 ± 1.2	11.4 ± 0.4	0,000
F6PPQ0_HORSE	CO2_GORGO Complement C2	5,2	8	7,9	13.5 ± 0.9	12.2 ± 0.3	0,004
F7BTW7_HORSE	CO3_BOVIN Complement C3	12,4	93	92,4	8.6 ± 4.1	3.8 ± 3.5	0,005
F6XSF7_HORSE	CO4A_HUMAN Complement C4-A	14,3	58	57,4	17.3 ± 1.5	15.3 ± 0.5	0,005
F6Q7J3_HORSE	CO7_PIG Complement C7	20,8	7	6,9	13.1 ± 1.6	11.0 ± 0.4	0,010
F7CFN5_HORSE	CO8A_HUMAN Complement component C8 alpha chain	114,2	2	1,9	10.3 ± 2.7	6.4 ± 2.2	0,010
F6TIN6_HORSE	C1QA_PIG Complement C1q subcomponent subunit A	3310,8	2	1,9	9.9 ± 4.8	2.5 ± 2.6	0,000
F7CZW9_HORSE	IC1_HUMAN Plasma protease C1 inhibitor	29,9	5	5,0	14.4 ± 1.6	11.4 ± 0.9	0,001
F7C0D9_HORSE	KNG1_HUMAN Kininogen-1	11,9	18	17,9	15.6 ± 1.3	13.8 ± 0.5	0,006
Koagulation							
F6X449_HORSE	A2AP_HUMAN Alpha-2-antiplasmin	7,9	7	7,0	14.1 ± 1.1	12.3 ± 0.9	0,005
F7CYR1_HORSE	ANT3_HUMAN Antithrombin-III	6,4	50	49,7	17.6 ± 0.9	15.9 ± 0.7	0,001
F7ABW7_HORSE	FA7_HUMAN Coagulation factor VII	Infinity	2	1,9	6.8 ± 4.7	0,00	0,00
F6RUZ6_HORSE	FIBA_HUMAN Fibrinogen alpha chain	57,9	29	28,8	10.2 ± 3.4	6.7 ± 1.5	0,002
F6PH38_HORSE	FIBB_HUMAN Fibrinogen beta chain	64,6	77	76,5	19.6 ± 2.0	16.2 ± 0.4	0,000
F6W2Y1_HORSE	FIBG_HUMAN Fibrinogen gamma chain	41,0	69	67,4	19.1 ± 1.8	16.2 ± 0.3	0,001
F7BM31_HORSE	HEP2_HUMAN Heparin cofactor 2	64,5	8	7,9	14.6 ± 2.0	10.8 ± 1.1	0,001
F6USP9_HORSE	PLMN_PONAB Plasminogen	13,8	25	24,7	15.2 ± 1.8	13.4 ± 0.7	0,028
F7BFJ1_HORSE	THRB_PIG Prothrombin	6,3	16	15,9	14.9 ± 1.0	13.4 ± 0.2	0,002

6.2.2. Auswahl weiterer *in-vivo* hochregulierter Proteine

Die nachfolgend aufgeführten Proteine sind in der *in-vivo* Gruppe signifikant hochreguliert, können jedoch keinem übergeordneten biologischen Prozess zugeordnet werden. Sie sollen im Weiteren isoliert betrachtet werden und sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Mittelwerte und Standardabweichungen für diese Proteine werden in Abbildungen präsentiert. Die Reihenfolge entspricht der Diskussion.

Tabelle 6: Die Auswahl weiterer *in-vivo* hochregulierter Proteine

Uniprot ID	Homologe Proteinbeschreibung	fold change	Peptidanzahl	Confidence score	p-Wert
F7CN11_HORSE	FINC_HUMAN Fibronectin	10.3	66	65.5	0.0040
F6SS57_HORSE	CRLD2_HUMAN Cysteine-rich secretory protein	6.8	16	15.9	0.0539
F6ZD61_HORSE (F7BSN5_HORSE)	ZP3R_CAVPO Zona pellucida sperm-binding	505.4	3	3.0	0.0002
Q28383_HORSE	HBA_EQUPR Hemoglobin subunit alpha	56.5	23	22.9	0.0092
F7DY34_HORSE	CSPG2_BOVIN Versican core protein	7.0	53	52.5	0.0056
F6QX36_HORSE	ITIH1_BOVIN Inter-alpha- trypsin inhibitor heavy chain	55.7	76	75.3	0.0001

6.2.2.1. Fibronectin

Das Fibronectin ist in der *in-vivo* Gruppe signifikant hochreguliert, mit einem p-Wert von ≤ 0.05 und einem fold change von > 2 . Mit einer Peptidanzahl von 66 konnte man das Protein identifizieren. Der Konfidenzwert für die Proteinidentifikation (Progenesis QI; Summe der „Peptide Prophet Scores“) dafür beträgt 65.5. Der normalisierte Mittelwert beträgt 7.23 *in-vivo* und 5.57 *in-vitro* mit einer Standardabweichung von ± 0.58 *in-vivo* und ± 0.32 *in-vitro*. Der fold change beträgt 10.3. Innerhalb der *in-vivo* Gruppe war es in zwei Proben (8KOK und 11KOK) nicht hochreguliert (Abb. 15).

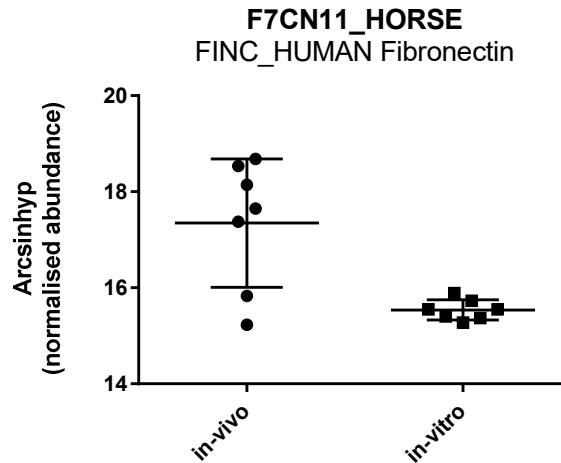


Abb. 15: Signifikante Hochregulation von Fibronectin in der *in-vivo* Gruppe ($p \leq 0.05$ und fold change > 2). Der normalisierte Mittelwert beträgt 17.4 *in-vivo* und 15.6 *in-vitro* (Standardabweichung von ± 1.3 *in-vivo* und ± 1.1 *in-vitro*).

6.2.2.2. Cystein-rich secretory protein

Das Cystein-rich secretory protein (CRISP) ist in unserem Versuch in der *in-vivo* Gruppe signifikant hochreguliert, mit einem p-Wert von ≤ 0.05 und einem fold change von >2 . Mit einer Peptidanzahl von 16 konnte das Protein identifiziert werden. Der Konfidenzwert dafür beträgt 15.9. Der normalisierte Mittelwert beträgt 14.74 *in-vivo* und 13.43 *in-vitro*, mit einer Standardabweichung von ± 1.54 *in-vivo* und ± 0.53 *in-vitro*. Der fold change beträgt 6.8. Bei zwei Proben (8KOK und 11KOK) in der *in-vivo* Gruppe ist das CRISP nicht hochreguliert. Deren Werte liegen nach der Normalisierung und Arcsinhyp-Transformation zwischen 12 und 14, in jenem Bereich, in dem die Werte der *in-vitro* Gruppe anzutreffen sind (Abb. 16). Bei der Betrachtung der Proben 8KOK und 11KOK im Laborprotokoll der *in-vivo* Gruppe sieht man als einzige Gemeinsamkeit, dass die Follikelflüssigkeit bei beiden Proben wässriger war, als bei den restlichen Proben.

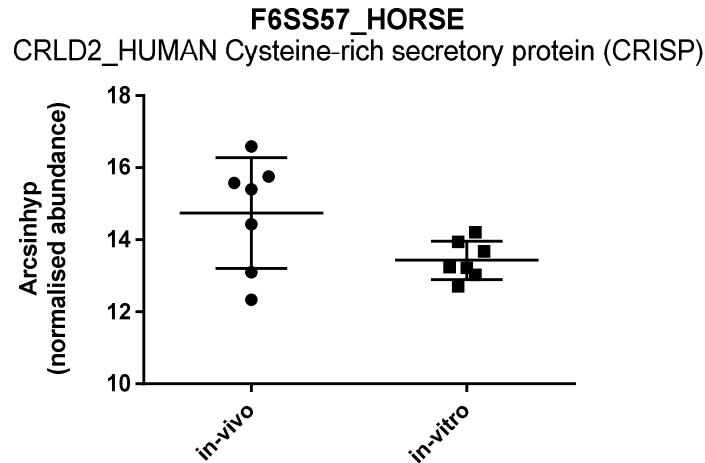


Abb. 16: Signifikante Hochregulation des Cystein-rich secretory protein (CRISP) in der *in-vivo* Gruppe ($p \leq 0.05$, fold change > 2). Der normalisierte Mittelwert ist 14.74 *in-vivo* und 13.43 *in-vitro* (Standardabweichung von ± 1.54 *in-vivo* und ± 0.53 *in-vitro*).

6.2.2.3. Zona pellucida sperm-binding protein receptor

Weiter ist der Zona pellucida sperm-binding protein receptor (ZP3R) in der *in-vivo* Gruppe signifikant hochreguliert, mit einem p-Wert von ≤ 0.05 und einem fold change von > 2 . Mit einer Peptidanzahl von 3, konnte man das Protein identifizieren. Der Konfidenzwert dafür beträgt 2.98. Der normalisierte Mittelwert beträgt 10.3 *in-vivo* und 3.3 *in-vitro*, mit einer Standardabweichung von ± 2.3 *in-vivo* und ± 1.1 *in-vitro*. Der fold change beträgt 505.4 (Abb. 17). In der *in-vitro* Gruppe sind zwei Proben (36KOKV und 41KOKV) hochreguliert für das ZP3R. Dessen Werte liegen nach Normalisierung und Arcsinhyp-Transformation zwischen 5 und 10, was immer noch im unteren Bereich der *in-vivo* hochregulierten Proteine liegt.

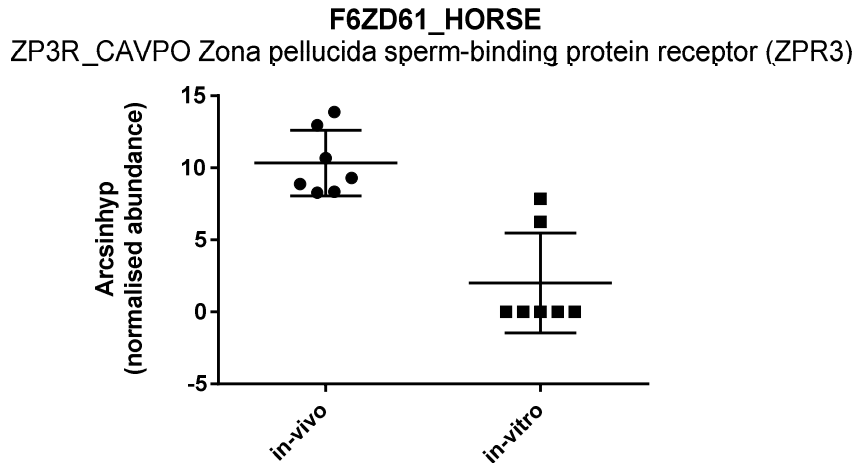


Abb. 17: Signifikante Hochregulation vom Zona pellucida sperm-binding protein receptor (ZP3R) in der *in-vivo* Gruppe ($p \leq 0.05$ und fold change > 2). Der normalisierte Mittelwert beträgt 10.3 *in-vivo* und 3.3 *in-vitro*, (Standardabweichung von ± 2.3 *in-vivo* und ± 1.1 *in-vitro*).

6.2.2.4. Hemoglobin subunit alpha

Die Hemoglobin subunit alpha (HBA) war mit einem p-Wert von ≤ 0.05 und einem fold change von > 2 hochreguliert. Mit einer Peptidanzahl von 23, konnte man das Protein identifizieren. Der Konfidenzwert dafür beträgt 22.9. Der normalisierte Mittelwert beträgt 16.9 *in-vivo* und 14.4 *in-vitro*, mit einer Standardabweichung von ± 2.1 *in-vivo* und ± 0.8 *in-vitro*. Der fold change beträgt 56.5. Eine Probe (15KOK) innerhalb der *in-vivo* Gruppe ist nicht hochreguliert (Abb. 18).

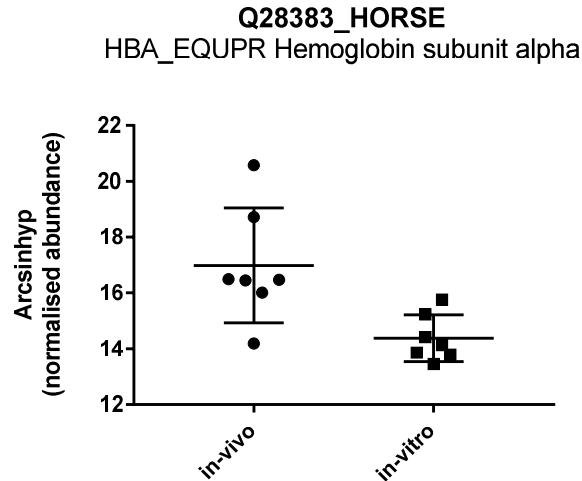


Abb. 18: Signifikante Hochregulation von Hemoglobin subunit alpha (HBA) in der *in-vivo* Gruppe ($p \leq 0.05$ und fold change > 2). Der normalisierte Mittelwert beträgt 16.9 *in-vivo* und 14.4 *in-vitro*, (Standardabweichung von ± 2.1 *in-vivo* und ± 0.8 *in-vitro*).

6.2.2.5. Versican core protein

Hochregulation des Versican core Proteins (Vcan), mit einem p-Wert von ≤ 0.05 und einem fold change von > 2 . Mit einer Peptidanzahl von 53, konnte man das Protein identifizieren. Der Konfidenzwert dafür beträgt 52.5. Der normalisierte Mittelwert beträgt 16.9 *in-vivo* und 15.2 *in-vitro*, mit einer Standardabweichung von ± 1.2 *in-vivo* und ± 0.6 *in-vitro*. Der fold change beträgt 7. Eine Probe (11KOK) innerhalb der *in-vivo* Gruppe ist nicht hochreguliert (Abb. 19).

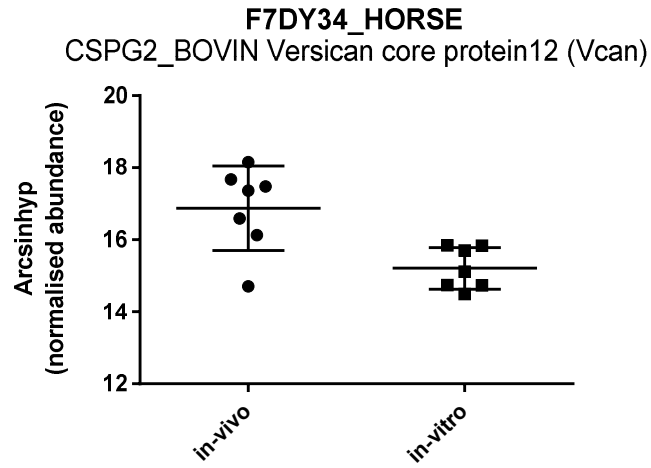


Abb. 19: Signifikante Hochregulation von Versican core protein 12 (Vcan) in der *in-vivo* Gruppe ($p \leq 0.05$ und fold change > 2). Der normalisierte Mittelwert beträgt 16.9 *in-vivo* und 15.2 *in-vitro*, (Standardabweichung von ± 1.2 *in-vivo* und ± 0.6 *in-vitro*).

6.2.2.6. Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain

Der Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (ITIH), wird in der Diskussion zusammen mit dem Vcan diskutiert. ITIH ist ebenfalls hochreguliert in der *in-vivo* Gruppe, mit einem p-Wert von ≤ 0.05 und einem fold change von >2 . Der normalisierte Mittelwert beträgt 19.7 *in-vivo* und 16.2 *in-vitro*, mit einer Standardabweichung von ± 1.5 *in-vivo* und ± 0.3 *in-vitro*. Der fold change beträgt 55.7. Innerhalb der *in-vivo* Gruppe ist wieder eine Probe (11KOK) nicht hochreguliert (Abb. 20).

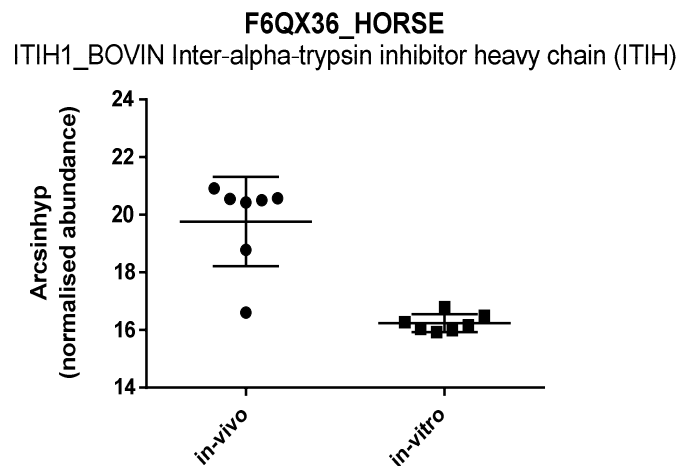


Abb. 20: Signifikante Hochregulation von Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (ITIH) in der *in-vivo* Gruppe ($p \leq 0.05$ und fold change >2). Der normalisierte Mittelwert beträgt 19.7 *in-vivo* und 16.2 *in-vitro*, (Standardabweichung von ± 1.6 *in-vivo* und ± 0.3 *in-vitro*).

6.3. *In-vitro* hochregulierte Proteine

Von den 248 signifikant unterschiedlichen Proteinen waren 144 Proteine in der *in-vitro* Gruppe signifikant hochreguliert. Für die Analyse auf überrepräsentierte Stoffwechselwege wurde die Liste der zu analysierenden Proteine um eine Uniprot Accession gekürzt, die auf ein homologes Protein verwies. Somit wurden nur 143 Proteine in die Datenbank eingegeben, von diesen fand sich für 12 Proteine keine Übereinstimmung der Protein Accession Number in der String DB, so dass es 131 Treffer gab, die für die Analyse genutzt werden konnten. Für die *in-vitro* hochregulierten Proteine ergab die Enrichment-Analyse keine signifikant hochregulierten Stoffwechselwege. Einige Proteine lassen sich jedoch ebenfalls einigen interessanten KEGG Stoffwechselwegen zuordnen: Adherens Junction (Pathway ID 04520), Fatty Acid Metabolism (Pathway ID 01212), Biosynthesis of Amino Acids (Pathway ID 01230) (Abb. 21).

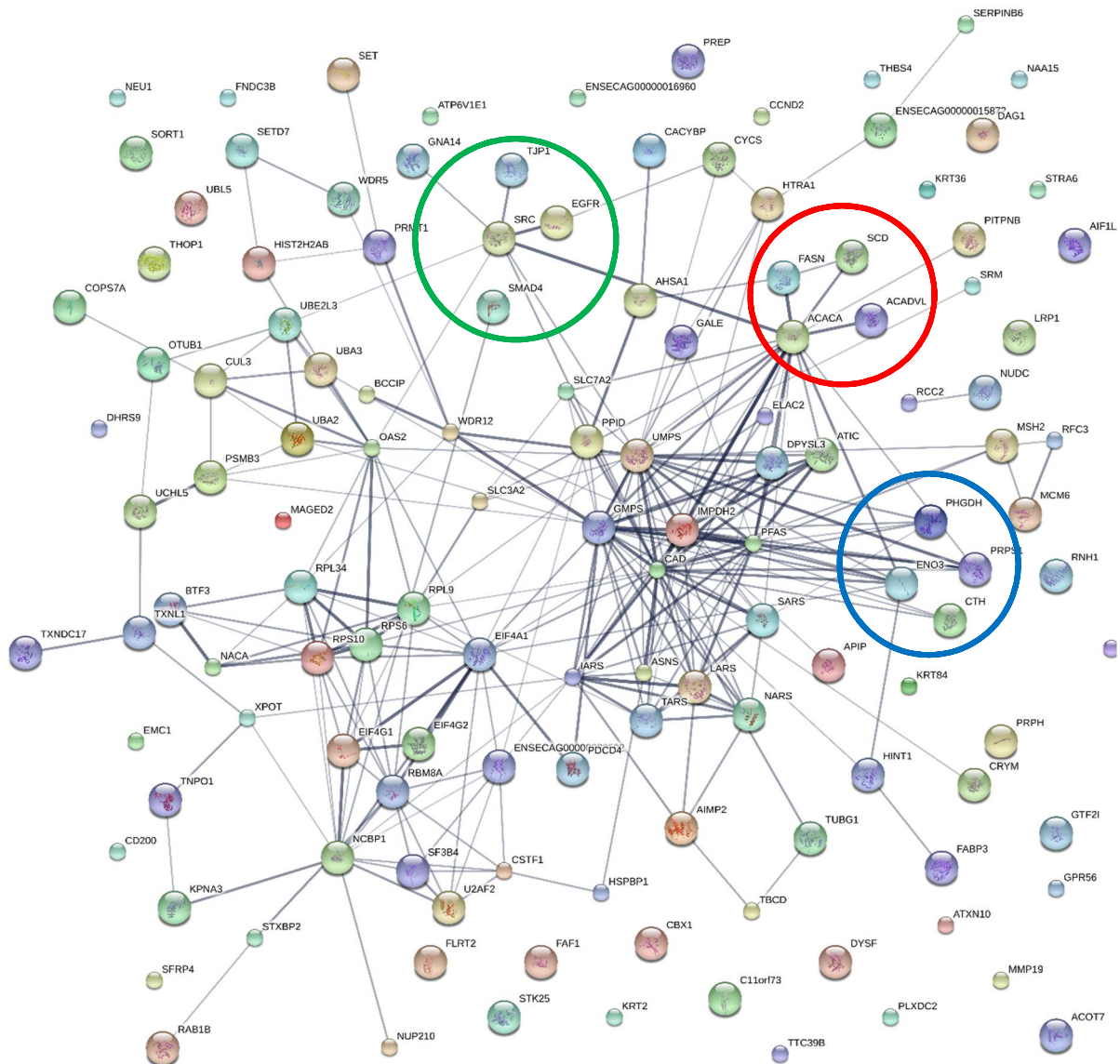


Abb. 21: Interaktionsnetzwerk der 144 *in-vitro* hochregulierten Proteine (Interaktionswert: mittlere Konfidenz (0.4)). 131 Proteine wurden in der Datenbank gefunden. Es fanden sich keine signifikant überrepräsentierten Stoffwechselwege. Interessante KEGG Stoffwechselwege wurden mit Kreisen markiert: Grün: Adherens Junction (Pathway ID 04520), Rot: Fatty Acid Metabolism (Pathway ID 01212), Blau: Biosynthesis of Amino Acids (Pathway ID 01230).

Auch für die *in-vitro* hochregulierten Proteine wurden einige biologisch interessante Kandidaten für eine genauere Beschreibung und Diskussion selektiert.

Tabelle 7 zeigt eine Zusammenfassung dieser Proteine in alphabetischer Reihenfolge. Die Reihenfolge der Proteine im Text ist analog zur Reihenfolge der Abhandlung der Proteine in der Diskussion.

Tabelle 7: *In-vitro* hochregulierte Proteine

Uniprot ID	Homologe Proteinbeschreibung	fold change	Peptidanzahl	Confidence score	p-Wert
F6Q6W4_HORSE	FABPH_PIG Fatty acid-binding protein	40.1	3	3.0	0.00012
F6U276_HORSE	HPBP1_RAT Hsp70-binding protein 1	5.2	4	4.0	0.00224
F7C6S0_HORSE	MMP19_HUMAN Matrix metalloproteinase-19	13.9	10	9.9	0.00031
F7BAI2_HORSE	SFRP4_HUMAN Secreted frizzled-related protein 4	34.5	6	6.0	0.00002
F6W8C8_HORSE	SPB6_PONAB Serpin B6	3.1	18	17.8	0.00015

6.3.1. Fatty acid-binding protein

Das fatty acid-binding protein (FABP) ist in der *in-vitro* Gruppe signifikant hochreguliert, mit einem p-Wert von ≤ 0.05 , und einem fold change von > 2 . Mit einer Peptidanzahl von 3 konnte man das Protein rekonstruieren. Der Konfidenzwert dazu beträgt ebenfalls 3. Der normalisierte Mittelwert beträgt 8.1 *in-vivo* und 11,8 *in-vitro* mit einer Standardabweichung von ± 1.3 *in-vivo* und ± 1.2 *in-vitro*. Der fold change beträgt 40.1 (Abb. 22).

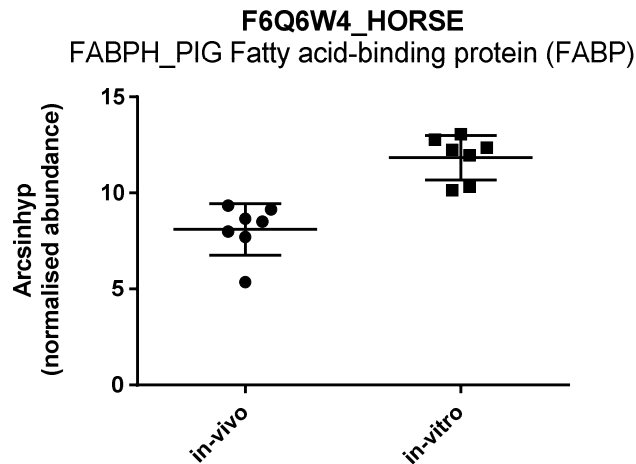


Abb. 22: Signifikante Hochregulation des Fatty acid-binding Proteins (FABP) in der *in-vitro* Gruppe ($p \leq 0.05$ und fold change > 2). Der normalisierte Mittelwert beträgt 8.1 *in-vivo* und 11.8 *in-vitro* (Standardabweichung von ± 1.3 *in-vivo* und ± 1.2 *in-vitro*).

6.3.2. Secreted frizzled-related protein

Das secreted frizzled-related protein (SFRP4) ist in der *in-vitro* Gruppe signifikant hochreguliert, mit einem p-Wert von ≤ 0.05 und einem fold change von >2 . Mit einer Peptidanzahl von 6 konnte das Protein identifiziert werden. Der Konfidenzwert dazu beträgt ebenfalls 6. Der normalisierte Mittelwert beträgt 10.6 *in-vivo* und 14.1 *in-vitro*, mit einer Standardabweichung von ± 0.8 *in-vivo* und ± 1.0 *in-vitro*. Der fold change beträgt 34.5. Eine Probe (39KOKV) innerhalb der *in-vitro* Gruppe zeigte eine niedrige Regulation von SFRP4 (Abb. 23).

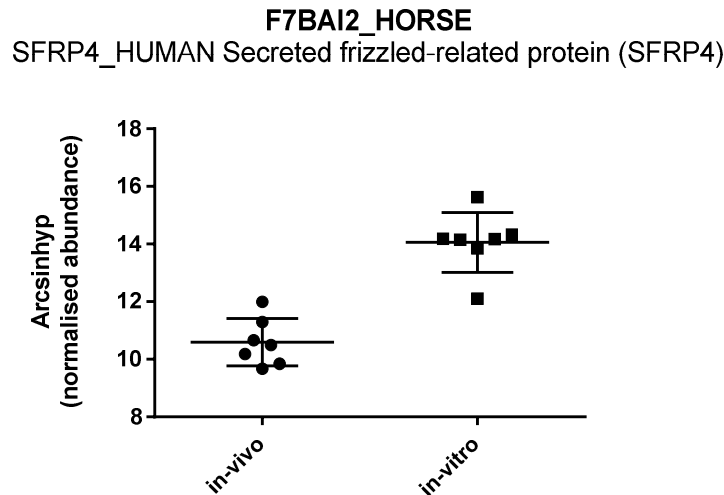


Abb. 23: Signifikante Hochregulation des secreted frizzled-related protein (SFRP4) in der *in-vitro* Gruppe ($p \leq 0.05$ und fold change >2). Der normalisierte Mittelwert beträgt 10.6 *in-vivo* und 14.1 *in-vitro*, (Standardabweichung von ± 0.8 *in-vivo* und ± 1.0 *in-vitro*).

6.3.3. Matrix metalloproteinase-19 und Hsp70-binding protein

Die Matrix metalloproteinase-19 (MMP) ist in der *in-vitro* Gruppe signifikant hochreguliert, mit einem p-Wert von ≤ 0.05 und einem fold change von >2 . Mit einer Peptidanzahl von 10, konnte das Protein rekonstruiert werden. Der Konfidenzwert dazu beträgt 9.9. Der normalisierte Mittelwert beträgt 12.0 *in-vivo* und 14.9 *in-vitro*, mit einer Standardabweichung von ± 1.3 *in-vivo* und ± 0.8 *in-vitro*. Der fold change beträgt 13.9 (Abb. 24). Im gleichen Zusammenhang wird in der Diskussion das Hsp70-binding protein (Hsp70) besprochen. Beide Proteine können mit dem Thema Hitzeschock in Verbindung gebracht werden. Hsp70 ist in der *in-vitro* Gruppe signifikant hochreguliert, mit einem p-Wert von ≤ 0.05 und einem fold change von >2 . Mit einer Peptidzahl von 4, konnte das Protein rekonstruiert werden. Der Konfidenzwert (hohe Konfidenz (0.7)) dazu beträgt 4. Der normalisierte Mittelwert beträgt 10.9 *in-vivo* und 12.7 *in-vitro*, mit einer Standardabweichung von ± 0.9 *in-vivo* und ± 0.8 *in-vitro*. Der fold change beträgt 5.2 (Abb. 25).

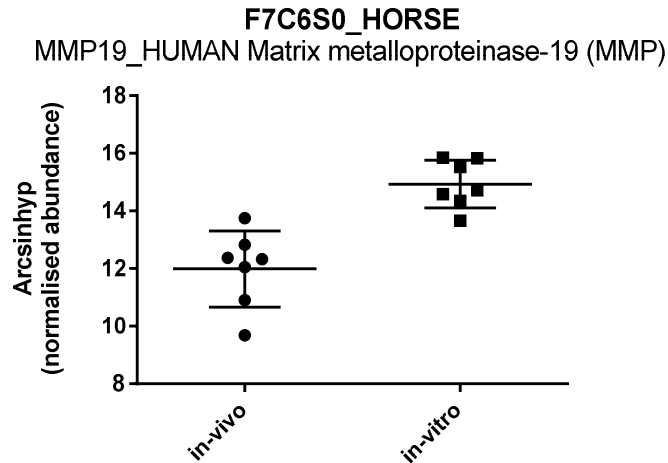


Abb. 24: Signifikante Hochregulation der Matrix metalloproteinase-19 (MMP) in der *in-vitro* Gruppe ($p \leq 0.05$ und fold change > 2). Der normalisierte Mittelwert beträgt 12.0 *in-vivo* und 14.9 *in-vitro*, (Standardabweichung von ± 1.3 *in-vivo* und ± 0.8 *in-vitro*).

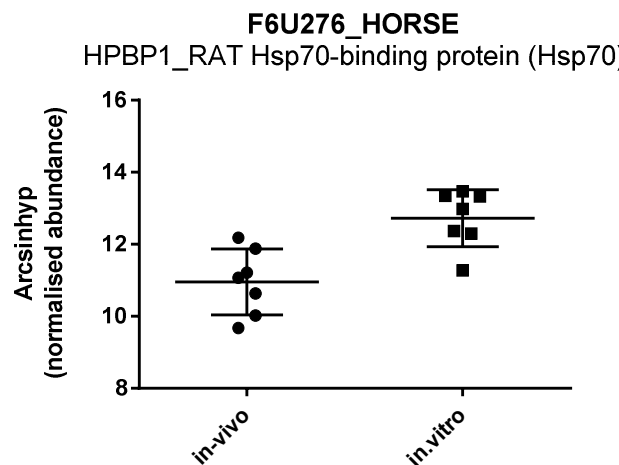


Abb. 25: Signifikante Hochregulation des Hsp70-binding protein (Hsp70) in der *in-vitro* Gruppe ($p \leq 0.05$ und fold change > 2). Der normalisierte Mittelwert beträgt 10.9 *in-vivo* und 12.7 *in-vitro*, (Standardabweichung von ± 0.9 *in-vivo* und ± 0.8 *in-vitro*).

6.3.4. Serpin

Das Protein Serpin B6 ist ebenfalls in der *in-vitro* Gruppe signifikant hochreguliert, mit einem p-Wert von ≤ 0.05 und einem fold change von > 2 . Mit einer Peptidanzahl von 18, konnte das Protein rekonstruiert werden. Der Konfidenzwert beträgt 17.8. Der normalisierte Mittelwert beträgt 15.5 *in-vivo* und 16.7 *in-vitro*, mit einer Standardabweichung von ± 0.4 *in-vivo* und ± 0.3 *in-vitro*. Der fold change beträgt 3.1 (Abb. 26).

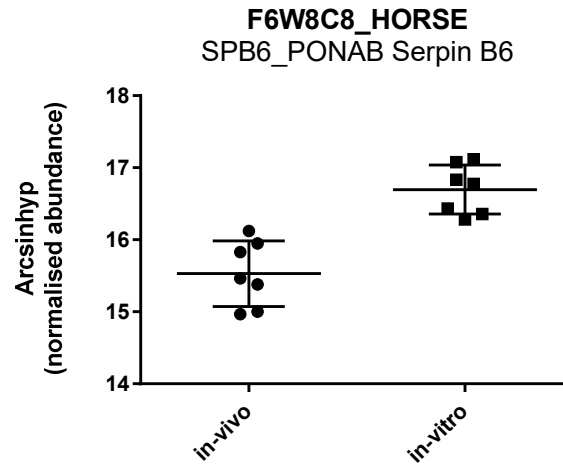


Abb. 26: Signifikante Hochregulation von Serpin B6 in der *in-vitro* Gruppe ($p \leq 0.05$ und fold change > 2). Der normalisierte Mittelwert beträgt 15.5 *in-vivo* und 16.7 *in-vitro*, (Standardabweichung von ± 0.4 *in-vivo* und ± 0.3 *in-vitro*).

7. DISKUSSION

7.1. Das Equine Kumulusproteom

Die grosse technische Herausforderung dieser Arbeit war die Analyse des Kumulusproteoms auf dem Level von einzelnen Kumulus-Oozyten-Komplexen (KOK). Bisher wurden entsprechende massenspektrometrische Untersuchungen nur an gepoolten Proben beim Rind durchgeführt. Memili et al. (2007) untersuchten das Proteom von maturierten bovinen Oozyten und Kumuluszellen in gepoolten Proben. Sie fanden 4395 Proteine, welche in den Kumuluszellen exprimiert wurden und 1092 Proteine, welche in Oozyten exprimiert wurden. Auchthundertachtundfünfzig Proteine wurden sowohl in Kumuluszellen als auch in Oozyten gefunden (Memili et al., 2007). In einer weiteren Proteomikstudie mit gepoolten Proben von nicht maturierten Oozyten und Kumuluszellen beim Rind wurden 811 Proteine in Oozyten und 1247 Proteine in Kumuluszellen gefunden, wovon 371 Proteine unterschiedlich zwischen den zwei Gruppen exprimiert waren (Peddinti et al., 2010). Diese Studien können als Vergleich zu unserer Studie dienen, in der beim equinen Kumulusproteom von einzelnen KOK insgesamt 3030 quantifizierbare Proteine gefunden wurden. Ohne single peptides und reverse hits waren es 2060 Proteine, wovon 242 Proteine, zwischen *in-vivo* und *in-vitro* maturierten Kumuluszellen signifikant unterschiedlich waren. Der Vergleich zu den gepoolten Studien beim Rind zeigt die Sensitivität und Effizienz der in unserer Studie angewandten Methode, da die Findungsrate von unterschiedlich exprimierten Proteinen fast gleich hoch war wie in gepoolten Proben, in denen der Proteingehalt entsprechend deutlich höher ist. Massenspektrometrische Analysen von equinen Kumuluszellen wurden erstmals in dieser Dissertation untersucht. Mit Hilfe des PANTHER Klassifikationssystems konnten die Proteine in Gene Ontology Gruppen eingeteilt werden. In der Gene Ontology Group „Cellular Component“ machte der grösste Teil der Proteine Bestandteile der extrazellulären Matrix aus (Abb. 12). Dies deutet auf die Wichtigkeit der Kumuluszellen und ihrer Kommunikation über Gap- und Tight-junctions mit der Oozyte hin. Der Metabolismus der extrazellulären Matrix in Verbindung mit den Kumuluszellen scheint also sehr aktiv zu sein. Dies deutet auf die hohe metabolische Aktivität der Kumuluszellen hin.

In den weiteren Kapiteln wird näher auf die ausgewählten *in-vivo* und *in-vitro* hochregulierten Proteine eingegangen, welche bei den Resultaten schon erwähnt wurden. Mit Hilfe von Parallelen zu anderen Proteomikstudien in der Reproduktionsmedizin wird versucht, eine Erklärung für die jeweilige Hochregulation der einzelnen Proteine abzugeben.

7.2. *In-vivo* hochregulierte Proteine

Von den 2060 detektierten Proteinen waren 242 Proteine signifikant ($p \leq 0,05$) unterschiedlich hochreguliert. 42.15% der Proteine sind in der *in-vivo* Gruppe hochreguliert und 57.85% Proteine in der *in-vitro* Gruppe. Im ersten Kapitel der Diskussion werden die Proteine der biologischen Gruppe „complement and coagulations cascades“ besprochen. Diese waren in der *in-vivo* Gruppe signifikant erhöht.

7.2.1. Komplement und Koagulationskaskade

Die Enrichment Analyse mit dem KEGG Stoffwechselweg der *in-vivo* hochregulierten Proteine ergab eine Überrepräsentation der Proteine aus dem biologischen Prozess Komplement und Koagulationskaskade (KKK) mit insgesamt 22 Proteinen. Diese Proteine sind alle signifikant hochreguliert, mit einem p-Wert < 0.05 und einem fold change > 2 . Es werden in diesem Kapitel nicht alle Proteine aus Tabelle 5 einzeln diskutiert, sondern nur die wichtigsten Komponenten der (KKK), und deren möglichen Einfluss auf den KOK während der Maturation. Einleitend wird an dieser Stelle die Funktionsweise des Komplementsystems erläutert.

Das Komplementsystem ist eine proteolytische Kaskade im Blutplasma und ein Mediator des innate Immunsystems, also ein unspezifischer Abwehrmechanismus gegen Pathogenitätsfaktoren. Es beinhaltet etwa zwei Dutzend Plasma Proteasen, die einander in kaskadenartiger Folge spalten und aktivieren. Man unterscheidet den klassischen, den alternativen und den Lektin Aktivierungsweg des Komplementsystems. Die Komponenten des klassischen und alternativen Weges bestehen aus kaskadenartig reagierenden Proteasen, die mit C und einer Nummer bezeichnet werden (Abb. 27). Die Spaltprodukte werden mit Kleinbuchstaben bezeichnet. Die erste Komponente kann z.B. durch Immunkomplexe (Antigen und Antikörper der Klassen IgG und IgM) aktiviert werden. Dadurch kommt es zur Bildung der C3-Konvertase des klassischen Weges. Bakterien und Zellen mit „aktivierenden Oberflächen“ vermögen die C3-Konvertase des alternativen Weges Antikörper unabhängig zu aktivieren, so dass es zur verstärkten Spaltung bzw. Aktivierung von C3 kommt. Durch die Spaltung von C3 werden die terminalen Komponenten (C5 bis C9) aktiviert und auf der Oberfläche von Zellen bzw. Erreger gebunden. Dadurch entstehen die biologisch wichtigen Komponenten C5a und C5b. Es formiert sich ein so genannter Membran-Attacke-Komplex (MAC) unter Bindung von C6, C7 und C8, die in die Polymerisierung von C9 und damit in einer Lyse von Zellen oder Bakterien mündet (Taylor et al., 1998).

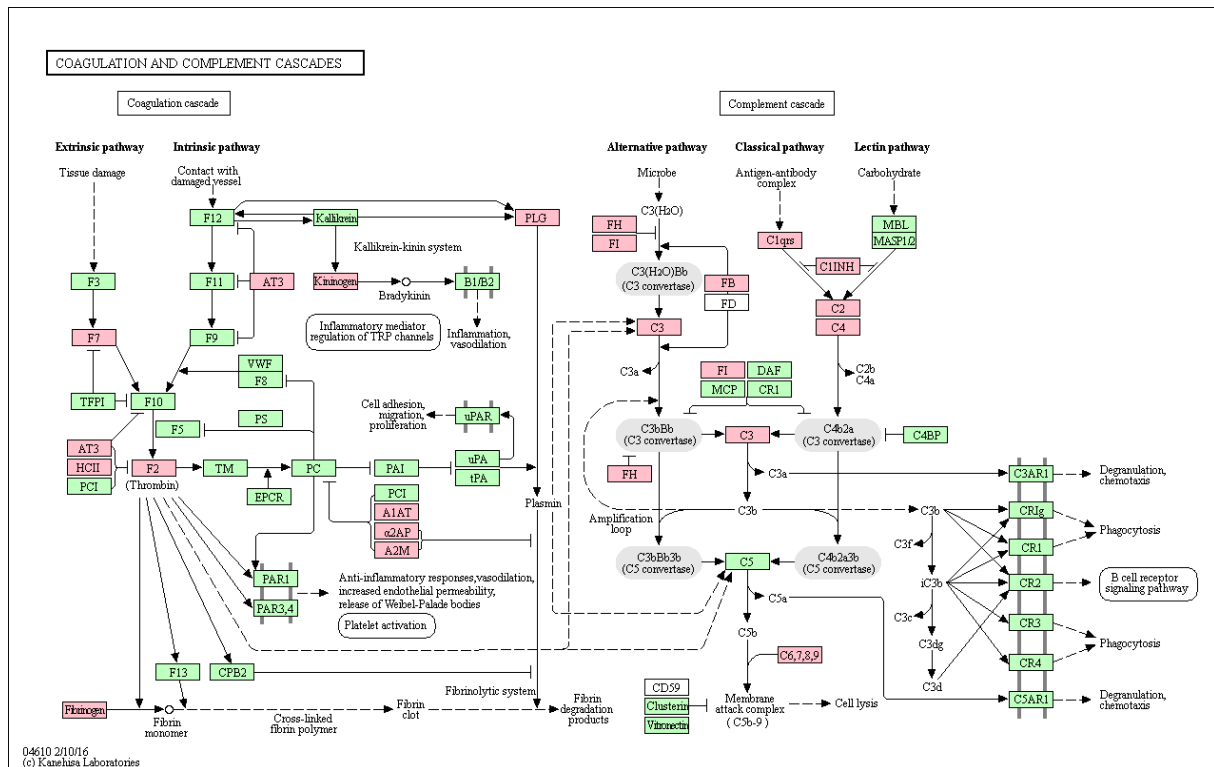


Abb. 27: Schematische Darstellung über den kaskadenartigen Ablauf der Komplement- und Koagulationskaskade. In rot sind die signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine zwischen des *in-vivo* und *in-vitro* maturierten Kumulus dargestellt.

Bei einer Aktivierung des Komplementsystems zerfällt immer die wichtigste Komponente C3 in C3a unter Abspaltung von C3a. Wenn eine aktivierende Oberfläche vorliegt, kommt es zur Aktivierung auf dem alternativen Weg. Andernfalls zerfällt C3b in Produkte, die von zellulären Rezeptoren erkannt werden.

Die Komplementkomponente C3 ist also ein zentrales Protein in der Komplementkaskade. In der vorliegenden Arbeit ist C3 zusammen mit C2, C4, C7, C8 und den Komplementfaktoren B, H und I, in der *in-vivo* Gruppe erhöht. Schon einleitend wurde erwähnt, dass die Präsenz des Komplementsystems in der Follikelflüssigkeit Einfluss auf den Ovulationsprozess hat. Studien über die Follikelflüssigkeit bei der Stute machten auf die Präsenz von Komplementproteinen in der Follikelflüssigkeit aufmerksam (Fahiminiya et al., 2011a; Fahiminiya et al., 2011b; da Silveira et al., 2012). In einer Proteomik Studie, in der Follikelflüssigkeit aus Follikeln während der späten Follikelphase analysiert wurde, konnten C1qA, C1s und r, C3 alpha und beta, C8 beta, Faktor B, C4 alpha und C8 nachgewiesen werden (Fahiminiya et al., 2011b). Mehrere Komplementproteine scheinen in „cell secreted vesicles“ in der Follikelflüssigkeit von Stuten vorzukommen (da Silveira et al., 2012). Bezogen auf die vorliegende Arbeit stellt sich die Frage, ob diese Bestandteile der KKK exklusiv aus den Kumuluszellen stammen, oder ob die Anreicherung auch aus der Follikelflüssigkeit stammt, aus der die KOK gewonnen wurden. Fahiminiya et al. (2011b) konnten zeigen, dass 83% der oben genannten Proteine aus der extrazellulären Matrix

stammen. Die restlichen 17% der Proteine stammen aus dem Intrazellularraum wie Zytoplasma oder Zytoskelett. Man kann davon ausgehen, dass beim Untergang von Granulosazellen während der Follikulogenese immer wieder Proteine aus dem Intrazellularraum in die Follikelflüssigkeit gelangen (Fahiminiya et al., 2011b) (Abb. 28). Diese Proteine aus der extrazellulären Matrix kommen entweder aus der Blutzirkulation oder werden von Granulosazellen sezerniert. Letzteres konnten Yoo et al. (2013) mittels Genanalyse (Gen-chip microarray) nachweisen. Sie konnten unter anderem zeigen, dass beim Menschen der Komplementfaktor C3 von den Granulosazellen sezerniert wird und eine wichtige Rolle beim Maturationsprozess von Mäuseoocyten hat. Mäuse, die C3 defizient waren, wiesen eine deutlich höhere Embryoverlustrate auf (Yoo et al., 2013) (Abb. 29). Die Expression von Komplementproteinen konnte auch für Kumuluszellen, Oozyten und Blastozysten dokumentiert werden (Taylor and Johnson, 1996; Georgiou et al., 2011). Dieses Erkenntnis unterstreicht die Wichtigkeit der Granulosazellen in der Kontrolle der Oocyte während des Maturationsprozesses. Es bestätigt die Hochregulation von C3 in der *in-vivo* Gruppe in unserem Versuch, und deutet auch beim Pferd auf den Einfluss des Komplementsystems am Ovulationsprozess hin. Es müssen weitere Untersuchungen über den Einfluss des Komplementsystems auf die IVM und die Spermien-Oozyten-Interaktion beim Pferd gemacht werden.

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen, in der *in-vivo* Gruppe hochregulierten Komplementproteine sind also bekannte Bestandteile im präovulatorischen Follikel. Die Funktion dieser Proteine in Kumulus und Follikelflüssigkeit ist allerdings noch unklar. Ein aktives Komplementsystem ist relevant für eine erfolgreiche Ovulation *in-vivo* (Perricone et al., 1990; Jarkovska et al., 2010). Während der follikulären Maturation entsteht durch den hohen Metabolismus oxidativer Stress. Dieser aktiviert das innate Immunsystem, welches die erste Entzündungsphase der Ovulation induziert (Spaniel-Borowski, 2011). Die positive Rolle von Komplement für die Maturation unter *in-vitro* Bedingungen wurde für die Maturation bei Schweineoocyten beschrieben. Die Maturation in der Präsenz von hitzeinaktivierten Komplementproteinen resultierte in reduzierten Maturationsraten, was aber reversibel war mit der Beigabe von iC3b, einem Spaltprodukt von C3 (Georgiou et al., 2011). C3 ist kein unbekanntes Protein im Reproduktionstrakt der Stute. Es ist in erhöhter Konzentration im Eileiter anzutreffen und ist nötig für die Bindung zwischen Spermium und Zona pellucida (Llanos et al., 2000). Gonzalès et al. (1992) beobachteten bei IVF höhere Teilungsraten von humanen Oozyten nach der Zugabe von C3. Im selben Kontext wirkt der Komplementfaktor I. Er spaltet C3 zu C3a und iC3b, welches in der Spermien-Oozyteninteraktion wichtig ist. Das iC3b bindet an Komplementrezeptoren an der Plasmamembran der Oocyte und des Spermiums (Anderson et al., 1993) (Abb. 30). Durch die Zugabe von iC3b unter IVF Bedingungen konnte eine erhöhte Maturationsrate von Schweineoocyten beobachtet werden (Georgiou et al., 2011). Ein besonderes Problem im Rahmen des IVF beim Pferd liegt in der Fertilisation der Oozyten nach *in-vitro* Maturation. Die Spermien schaffen es nicht IVM Oozyten zu penetrieren, welche aufgrund dessen mittels intrazytoplasmatischer Spermieninjektion befruchtet werden müssen (Leemans et al., 2016). Geht man davon aus, dass diese Probleme auf der weiblichen Seite sind, also einer inadäquaten Reifung der Oozyten *in-vitro*, könnte der Mangel an Komplementfaktoren in Kumuluszellen nach IVM

eine neue Hypothese für die Ursache dieses Problems darstellen. Um dies zu untermauern wären weitere Experimente notwendig, um die Rolle des Komplementsystems in der Vermittlung der Spermien-Oozyten-Interaktion beim Pferd weiter zu charakterisieren.

Complement factors mare follicular fluid:

Complement C1q subcomponent subunit A

Complement C1r subcomponent

Complement C1s subcomponent

Complement C3

Complement C4-A

Complement C5

Complement component C8 alpha chain

Complement component C8 beta chain

Complement component C8 gamma chain

Complement component C9

Complement factor B

Complement factor H

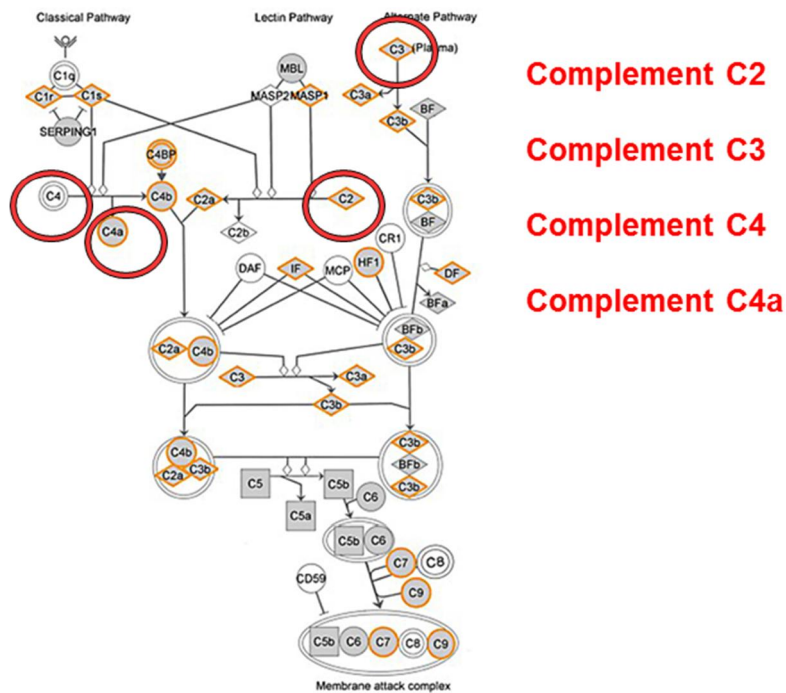
Complement factor I

Complement factor properdin

Complement regulator factor H

Fahiminiya et al. (2011). Proteomic analysis of mare follicular fluid during late follicle development. *Proteome Sci*, 9, 54.

Abb. 28: Komplement Faktoren, die in der Follikelflüssigkeit der Stute in einer Studie von Fahiminiya et al. (2011b) nachgewiesen wurden. In rot sind die Komplementfaktoren markiert, welche in unserem Versuch nachgewiesen wurden.



Yoo et al. (2013). Complement factors are secreted in human follicular fluid by granulosa cells and are possible oocyte maturation factors. J Obstet Gynaecol Res, 39(2), 522–527.

Abb. 29: Darstellung der Komplementfaktoren, wie sie in Granulosazellen vorkommen, aus einer Studie von Yoo et al. (2013). Rot umkreist sind die Komplementfaktoren, welche in unserer Studie nachgewiesen wurden.

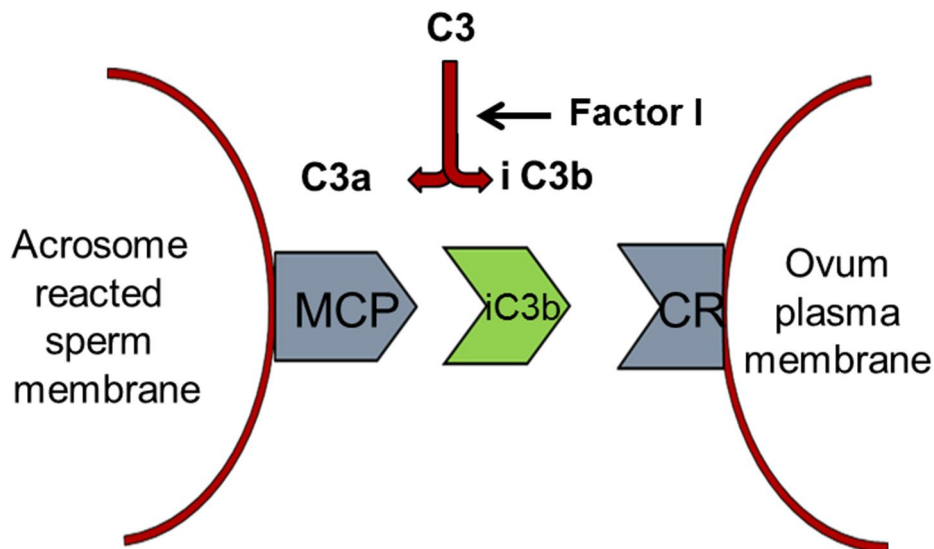


Abb. 30: Die potentielle Rolle von iC3b, einem Spaltprodukt von Komplement C3 durch Faktor I, in der Spermien-Oozyten Interaktion (Anderson et al., 1993).

Als weitere Gruppe der KKK sind die Akutphasenproteine zu erwähnen. Sie werden in der Leber koordiniert gebildet und in das Blutplasma abgegeben. Dazu gehören das Alpha-1-Antitrypsin, Serum-Amyloid A, Haptoglobin, und Fibrinogen, um die wichtigsten zu nennen. Die Bildung von Akutphaseproteinen wird durch Zytokine (z.B. IL-6) induziert. Sie sind in

mannigfacher Weise entzündungsfördernd. Oft wird deren Spiegel als Indikator für das Vorliegen einer Infektion oder einer Tumorerkrankung bestimmt. Die Wirkung der Akutphasenproteine ist vielfältig. Sie kann schmerzauslösend, gefässerweiternd, blutdrucksenkend, oder tachykard sein (Janeway, 2003). In der vorliegenden Arbeit sind die Akutphasenproteine Fibrinogen alpha, beta und gamma chain in der *in-vivo* Gruppe signifikant hochreguliert. Es sind Proteine, welche massgeblich an der Blutgerinnungskaskade beteiligt sind. Fibrinogen ist ein Glykoprotein, das in der Leber gebildet, und in das Blut ausgeschüttet wird. Es wird bei der Blutgerinnung durch die Serinprotease Thrombin in Fibrin umgewandelt, welches als Substrat der Gerinnung, zusammen mit den Thrombozyten, den Thrombus bildet (Cushman et al., 2006). In einer Studie von Yamada und Gentry (1995) wurden Gerinnungsfaktoren in der Follikelflüssigkeit von Stuten analysiert. Unter den dort festgestellten Gerinnungsfaktoren wurde das Fibrinogen genauer untersucht. Sie brachten dessen Vorkommen mit vermehrter Koagulation der Follikelflüssigkeit in Verbindung. Die Analyse von equiner Follikelflüssigkeit ergab eine 40% höhere Konzentration an Fibrinogen, verglichen mit normalem equinen Plasma (Yamada and Gentry, 1995). Es wird davon ausgegangen, dass das in der Follikelflüssigkeit gefundene Fibrinogen von Kumuluszellen gebildet wird (Fahiminiya et al., 2011b). Die Untersuchung der Genexpression von humanen Granulosa- und Kumuluszellen von präovulatorischen Follikeln ergab eine selektive Expression von Fibrinogen in Granulosazellen (Grondahl et al., 2012). Bei unserem Versuch konnte beobachtet werden, dass die Follikelflüssigkeit von den sprungreifen Follikeln aus der *in-vivo* Gruppe eine verstärkte Koagulation zeigte. Dies äusserte sich in Form von schleimiger Follikelflüssigkeit. Der Follikelinhalt war nicht flüssig, aber auch nicht komplett koaguliert. Es muss also ein Inhibitor der Koagulationskaskade im sprungreifen Follikel geben, so dass es zu keiner kompletten Koagulation der Follikelflüssigkeit kommt. Andererseits könnte man auch annehmen, dass nicht genug Fibrinogen vorhanden ist. Unter *in-vivo* Bedingungen ist es wichtig, dass die Fibrinform in der Follikelflüssigkeit inhibiert wird, bis die Oozyte fertig maturiert ist, sodass sie bei der Ovulation in den Eileiter abgegeben werden kann (Shimada et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden die Inhibitoren Antithrombin-III, Alpha-2-antiplasmin und Heparin Cofactor 2 identifiziert. Antithrombin-III und Heparin Cofactor 2 wirken inhibitorisch auf die Koagulation, während Alpha-2-antiplasmin inhibitorisch auf die Fibrinolyse wirkt. Fahiminiya et al. (2011b) konnten zeigen, dass Antithrombin-III die Blut-Follikelschranke nicht durchdringen kann. Man kann also davon ausgehen, dass es von Granulosa- und Kumuluszellen innerhalb des Follikels produziert wird. Es ist zu vermuten, dass durch Antithrombin-III die Follikelflüssigkeit nicht komplett koaguliert. Fahiminiya et al. (2011b) vermuten, dass Antithrombin-III hilft, die Follikelflüssigkeit in niedriger Viskosität zu halten, was den Transport der Eizelle in das Ovidukt vereinfachen würde. Eine Hochregulation von Antithrombin-III von *in-vivo* erfolgreich maturierten KOK kann mit einer höheren chemoattraktiven Funktion für Spermien und dessen erhöhter Motilität in Verbindung gebracht werden. Das mag eine Erklärung dafür sein, dass KOK nach *in-vivo* Maturation eine höhere Fertilisationsrate zeigen, als nach IVM (Leibfried-Rutledge et al., 1987). Diese Erkenntnisse scheinen eine plausible Erklärung für das Vorkommen von Antithrombin-III in der *in-vivo* Gruppe zu sein. Unter *in-vitro* Bedingungen

scheint es ein Defizit in der Produktion von Antithrombin-III im Vergleich zur *in-vivo* Gruppe zu geben.

7.2.3. Die Rolle der Komplementfaktoren als Bestandteil des innate Immunsystems

beim Ovulationsprozess

Die in der *in-vivo* Gruppe erhöhten Komplementsystemkomponenten C1, C2, C3, C4, Komplement Faktor B und H sind auch Bestandteil des innate Immunsystems (INIM) (Rock et al., 2010). Im vorhergehenden Kapitel wurde allgemein über die Herkunft und Wirkungsweise der Proteine der KKK im Reproduktionstrakt der Stute diskutiert. In diesem Kapitel soll spezifischer auf die Rolle des INIM am Ovulationsprozess eingegangen werden. Anhand des Beispiels von Komplement C3 ist bekannt, dass Komplementkomponenten von den Kumuluszellen selber sezerniert werden können und einen positiven Einfluss auf die Maturation von Oozyten haben (Georgiou et al., 2011). Um den Einfluss des INIM am Ovulationsprozess zu verstehen, wird zuerst auf dessen Funktionsweise eingegangen, und später auf die Proteine, welche in unserem Versuch in der *in-vivo* Gruppe erhöht waren, und Teil des INIM sind.

Die Ovulation wird in drei Phasen eingeteilt: die Entzündungsphase, die Ruptur des Graafschen Follikels und die Reparationsphase (Squires et al., 1974). Es ist ersichtlich, dass die drei Phasen die klassischen Sequenzen einer akuten, sterilen Entzündung repräsentieren. Dabei spielt das innate Immunsystem (INIM) eine zentrale Rolle (Rock et al., 2010). Das INIM ist an erster Stelle, wenn es um das Erkennen von Krankheitserregern und der Erkennung von absterbenden Zellen beziehungsweise Geweben geht (Turvey and Broide, 2010). Die dendritischen Zellen des INIM sind dicht bestückt mit sogenannten pattern-recognition receptors (PRRs) (O'Neill and Bowie, 2007). Zu ihnen gehören auch die toll-like-receptors (TLR). Im Unterschied zu den Lymphozyten des adaptiven Immunsystems, können die dendritischen Zellen des INIM Muster bzw. Komplexe wie z.B. Lipide, Proteine, oder Nukleinsäuren erkennen. Die Entdeckung von PRRs hat dazu geführt, dass man ein neues Gefahrenerkennungsmodell des INIM entwickeln konnte. Jeglicher Gewebe- oder Zellschaden ist mit der Freisetzung von Alarmsignalen verbunden (Bianchi, 2007). Solche Alarmsignale sind Proteine, wie z.B. das Akutphasenprotein Fibrinogen. Diese Produkte kommen auch in der Follikelflüssigkeit des präovulatorischen Follikels vor (Angelucci et al., 2006). Sie binden an die PRRs der dendritischen Zellen, was eine Signalkaskade innerhalb des INIM auslöst. Auf diese Weise wird der Zelltod, die Entzündungsreaktion (Rekrutierung von Leukozyten, Angiogenese, Zellwachstum), aber auch die Zell- und Gewebereparatur gesteuert (O'Neill and Bowie, 2007).

Das zyklische Ovar ist in ständigem Umbau von der Follikulogenese über die Ovulation und der anschließenden Anbildung eines Gelbkörpers bis hin zur Regression. Es ist naheliegend, und wurde auch schon beschrieben, dass das INIM an diesen Ab- und Umbauvorgängen beteiligt ist (Spaniel-Borowski, 2011). Überzeugende Hinweise, dass das INIM am Ovulationsprozess beteiligt ist, kommen aus Analysen der Genexpression von Granulosa- und Kumuluszellen. Sie zeigen eine Genaktivierung der TLR Familie, die exklusiv in

Immunzellen des INIM gefunden werden (Shimada et al., 2006). Die Beteiligung des Immunsystems am Ovulationsprozess lässt auf eine akute, sterile Entzündung schließen (Spaniel-Borowski, 2011). Diese Beobachtung stimmt auch mit unseren Ergebnissen überein. Aus den Proteinen der biologischen Gruppe der „Komplement und Koagulationskaskade“ und bei der Proteingruppen des INIM wurden als wichtige Repräsentanten Komplement C3, Komplementfaktor B sowie Fibrinogen und Antithrombin-III nachgewiesen. Somit könnten die Proteine der KKK in der *in-vivo* Gruppe hochreguliert sein, weil das INIM beim Entzündungsprozess während der Ovulation aktiviert wird. Es kommt zur Freisetzung von Fibrinogen, welches an die PRRs von dendritischen Zellen bindet und die Signalkaskade des INIM anregt. Bei der Maturation *in-vitro* scheint es Defizite in der Produktion von Proteinen des INIM zu geben. Es ist denkbar, dass das INIM nicht nur am Ovulationsprozess beteiligt ist, sondern auch verantwortlich für die Entwicklungskompetenz von Oozyten ist. Da das INIM *in-vitro* unterrepräsentiert ist, könnte dies ein Grund für die verminderte Entwicklungskompetenz von *in-vitro* maturierten Eizellen sein.

7.2.4. Fibronectin

Es erstaunt nicht, dass Fibronectin bei den *in-vivo* maturierten Oozyten hochreguliert ist, wenn man sich mit der vorhandenen Literatur zu diesem Protein im entsprechenden Kontext beschäftigt. Fibronectin wird aktiv von den Corona radiata Zellen produziert (Familiari et al., 1996). Es gibt fünf verschiedene Isoformen von Fibronectin. Sie werden unter dem Begriff „embryo-specific fibronectin 1 transcript variant“ (FN1) zusammengefasst und sind Teil der extrazellulären Matrix. Es gibt eine Kumuluspezifische Variante, welche schon beim Rind beschrieben wurde (Goossens et al., 2009). Wie oben beschrieben, ist es als Aktivator der KKK Signalkaskade beteiligt. Es ist aber auch an verschiedenen anderen biologischen Ereignissen beteiligt. Dazu gehört die Aufrechterhaltung der normalen Zellmorphologie, Differenzierung, Wundheilung, und Zellmigration. Insbesondere ist Fibronectin an der Bildung der Blastozyste und am Implantationsprozess des Embryos beteiligt. Dies wurde an der Maus getestet, indem Zellen von Blastozysten auf die Expression von Fibronectin untersucht wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Fibronectin vom frühen bis zum späten Blastozystenstadium signifikant zunahm (Morin and Sullivan, 1994). Tsuiki et al. (1988) untersuchten Fibronectin aus Follikelflüssigkeit von Frauen, bei denen eine IVF durchgeführt werden sollte. Sie zeigten, dass Fibronectin mit dem Progesteronlevel anstieg, was mit einer positiven Maturationsrate der Oozyten korrelierte. Nur die Fibronektinkonzentrationen aus Follikeln, deren Oozyten erfolgreich befruchtet wurden, zeigten einen signifikanten Anstieg (Tsuiki et al., 1988). Das Gen FN1 war überexprimiert in Kumuluszellen von jungen Frauen, verglichen mit älteren Frauen (Al-Edani et al., 2014). Es wird eine bessere Oozytenqualität beobachtet, wenn die direkte Umgebung der Oozyten hohe Konzentrationen an Fibronectin aufweisen (Honda et al., 2004). Bei bovinen Embryonen, welche aus *in-vivo* KOK produziert wurden, konnten höhere Fibronektinkonzentrationen festgestellt werden als bei *in-vitro* produzierten Embryonen (Betteridge and Flechon, 1988). Dies korreliert mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der Fibronectin bei den *in-*

vivo maturierten KOK signifikant erhöht war. Eventuell hat Fibronectin auch einen direkten Effekt auf die Fertilisationsrate von equinen Oozyten. Unter *in-vitro* Bedingungen herrscht ein deutliches Defizit in der Produktion von Fibronectin. Eine mögliche Erklärung dafür könnte der fehlende LH-Anstieg unter *in-vitro* Bedingungen sein.

7.2.5. Cysteine-rich secretory protein (CRISP)

Ein sehr vielversprechendes Protein stellt das Cystein-rich secretory protein (CRISP) dar. Es gehört zur Familie der CAPs (Cystein-rich secretory proteins, Antigen-5 und pathogenesis related-1). Die CAPs können in neun Unterfamilien eingeteilt werden, wobei eine Familie die CRISP's darstellen. Die CAP Proteine sind eng mit dem Reproduktionstrakt verbunden und haben einen direkten Einfluss auf die Fertilität. Vor allem im männlichen Reproduktionstrakt sind sie, und insbesondere die CRISP Proteine, für die Spermatogenese und die abschliessende Fertilisation verantwortlich (Gibbs et al., 2008). CRISP2 wird in späten Pachytän Spermatozyten produziert und ist im Akrosom des Spermienkopfes lokalisiert (Hardy et al., 1991). Seine Funktion besteht in der Induktion der Motilität der Spermatozyten beim Eintritt in den weiblichen Reproduktionstrakt. In unserem Versuch ist CRISP in den *in-vivo* maturierten KOK signifikant erhöht. Um seine Wirkungsweise im weiblichen Reproduktionstrakt zu verstehen, sei im Folgenden kurz die Physiologie der Spermienkapazitation erklärt.

Beim Eintritt in den weiblichen Geschlechtstrakt durchlaufen die Spermienzellen die letzte Stufe der Maturation, genannt Kapazitation. Dabei erlangen sie die Möglichkeit an die Zona pellucida einer Eizelle zu binden. Es kommt zur Akrosomenreaktion und zu Hypermotilität der Spermienzelle. Dieser Vorgang wird durch einen Kalziumausstrom reguliert. Daran ist CRISP2 regulatorisch beteiligt, indem es an die Kalziumkanäle bindet (Gibbs et al., 2008). Die Kapazitation findet im weiblichen Reproduktionstrakt statt und ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Fertilisation. Die eigentliche Funktion von CRISP2 beruht auf seiner Wirkung als Dekapazitationsfaktor. Solche kapazitationshemmenden Faktoren werden benötigt, damit es nicht zu früh zu einer Kapazitation kommt. Der Dekapazitationsfaktor CRISP2 ist von epididymalem Ursprung und wird beim Eintritt in den weiblichen Reproduktionstrakt oder unter *in-vitro* Inkubation abgegeben. CRISP2 wirkt an den Ionenkanälen des Spermienkopfes, und hemmt den Kalziumausstrom (Roberts et al., 2003). Wird CRISP im weiblichen Reproduktionstrakt abgestossen, kommt es zum Kalziumausstrom und zur Kapazitation. Inwiefern CRISP die Bindung zwischen Eizelle und Spermium unter *in-vitro* Bedingungen beeinflusst, ist noch unklar.

Bis jetzt wurden die CRISP Proteine im weiblichen Reproduktionstrakt erst wenig untersucht. Es wurden schon CRISP Proteine im Mäuseuterus nachgewiesen, welche von sekretorischen Epithelialzellen produziert wurden. Brukman et al. (2016) konnten zeigen, dass bei CRISP defizienten Mäusen einen signifikanten Rückgang der Fertilisationsrate zu beobachten war (Brukman et al., 2016). In einer anderen Studie von Da Ros et al. (2015) wurde die Abhängigkeit einer erfolgreichen Kapazitation von CRISP bei humanen Spermien aufgezeigt. Sie fanden CRISP im männlichen Geschlechtstrakt, im Nebenhoden, und konnten den Erfolg

einer Fertilisation mit dessen Vorkommen in Verbindung bringen (Da Ros et al., 2015). Es wird vermutet, dass eine Vielzahl an Proteinen der CAP Familie auch im Ovar zu finden ist (Reddy et al., 2008). Diese Vermutung kann durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden. Es wurden sowohl bei *in-vivo* als auch bei *in-vitro* maturierten Oozyten CRISP gefunden. Die Rolle bei der Bindung zwischen Spermium und Eizelle wurde schon diskutiert, wobei sich dies auf die Herkunft von CRISP aus dem männlichen Reproduktionstrakt bezog, welches beim Eintritt in den weiblichen Reproduktionstrakt abgestossen wird. Mit der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass CRISP auch im Ovar, genauer gesagt in KOK, vorkommt. Unter Umständen ist CRISP nicht nur für die Bindung zwischen Spermium und Eizelle notwendig, sondern auch für die Anziehung der Spermien in Richtung Zona pellucida. Diese Hypothese hat seinen Hintergrund aus den Erkenntnissen der Analyse der gallertigen Eimasse des Laubfrosches (*Xenopus laevis*). Darin wurde ein Protein namens Allurin identifiziert, welches als Lockstoff für Spermien fungiert. Allurin war das erste Protein, welches als chemoattraktiver Lockstoff für Spermien identifiziert wurde (Al-Anzi and Chandler, 1998). Allurin hat genetisch gesehen die höchste Sequenzähnlichkeit zu den CRISPs mit einer Homologie von 40% (Olson et al., 2001). Es ist somit denkbar, dass CRISP Proteine nicht nur in den Kumuluszellen, sondern auch im Eileiter vorkommen und dort ihre chemoattraktive Wirkung auf Spermien ausüben. Inwiefern unter IVF Bedingungen das CRISP Einfluss auf die Bindung zwischen Spermium und Eizelle hat, könnte in weiteren Versuchen untersucht werden.

7.2.6. Zona pellucida sperm binding Protein 3 Receptor und Complement component 4 binding protein

Die Zona pellucida (ZP) ist eine Matrix aus extrazellulären Glykoproteinen, welche die Oocyte umgibt. Diese Matrix besteht bei den meisten Säugetierspezies aus drei verschiedenen Glykoproteinen, dem ZP1, ZP2 und ZP3 (Bleil and Wassarman, 1980). Auf der Oberfläche von ZP3 sind spezifische Kohlenhydrate vorhanden, welche von komplementären Zona-bindenden Proteinen auf der Plasmamembran von Spermien erkannt werden (Wassarman, 1999). In der vorliegenden Studie war der Zona pellucida sperm binding Protein 3 Receptor (ZP3R) aus *in-vivo* maturierten KOK signifikant hochreguliert. Die β 1,4-Galactosyltransferase I (GalTI) ist das Protein auf der Seite des Spermiums, welches das Rezeptorprotein ZP3 auf der Seite der Oocyte erkennt und daran bindet (Miller et al., 1992). Dieser Vorgang ist ein wesentlicher Bestandteil der Akrosomreaktion. Diese besteht aus verschiedenen nacheinander folgenden Vorgängen. Als erstes kommt die Spermienkapazitation, gefolgt von der Spermien-Oocyte Erkennung und dann der Spermien-ZP Bindung. Dem ZP3 wird die grösste Bedeutung als Signalmolekül der ZP-Glykoproteine für die Induktion der Akrosomreaktion beigemessen (Bleil and Wassarman, 1988). Es wurde gezeigt, dass es ohne GalTI zu keiner Bindung zwischen Akrosom und ZP kommt (Miller et al., 1992). Diese beiden Proteine sind also essentiell für eine erfolgreiche Fertilisation. Nach der Bindung von GalTI und ZP3 kommt es auf der Seite der Eizelle zur Sekretion von Kortikalgranula, welche die spermienbindende Aktivität von ZP3 eliminiert und somit eine

Polyspermie verhindert. Die gesamte Akrosomreaktion ist von Kalzium abhängig. Auf der einen Seite dient das Akrosom selbst als Kalziumspeicher, auf der anderen Seite wird durch die GalTI-ZP3 Bindung der signalübermittler G-Protein aktiviert, was einen weiteren intrazellulären Kalziumanstieg in der Eizelle bewirkt (Gong et al., 1995).

Das eigentliche hier zu diskutierende Protein ist das Rezeptorprotein „Zona pellucida sperm binding protein 3 Receptor“ (ZP3R). Es kommt auf der Seite des Spermiums in der akrosomalen Matrix vor (Bleil and Wassarman, 1980). In der vorliegenden Untersuchung wurde es aber in Kumuluszellen gefunden. Möglicherweise hat es hier eine bisher nicht bekannte Funktion oder aber es handelt sich um ein orthologes Protein. Das sind Proteine, welche im Peptidaufbau sehr ähnlich sind, und dessen codierende Gene hochkonserviert sind. In der Datenbank des National Center for Biotechnology Information in Rockville, USA (<https://ncbi.nlm.nih.gov>) konnte das Protein complement component 4 binding protein alpha (C4BPA) gefunden werden, welches ortholog zu ZP3R ist. C4BPA wirkt regulatorisch in der Komplementkaskade (Nonaka et al., 2003), was erklären kann, dass C4BPA, wie die weiteren genannten Proteine der Komplementkaskade, in der *in-vivo* Gruppe hochreguliert ist. Unklar ist, wieso das ZP3R in der *in-vitro* Gruppe nur in kleinen Mengen vorkommt.

Am Ovulationsprozess sind verschiedene Faktoren des Komplementsystems, wie die Komplementkomponente C3b, beteiligt. Dessen Funktion wird als eine Art Opsonisierung der Spermien betrachtet, so dass diese von der Eizelle besser erkannt werden können (Riley-Vargas et al., 2005). So besteht die Möglichkeit, dass die Komplementfaktoren auch für die Ausbildung von Rezeptoren an der ZP verantwortlich sind, wie z.B. vom ZP3R. Um dies zu bestätigen müsste unter *in-vitro* Bedingungen untersucht werden, ob die Konzentration an ZP3R nach Zugabe von Komplementfaktoren ansteigt.

7.2.7. Hemoglobin subunit alpha

Bei Säugetieren ist Hämoglobin (Hb) das sauerstoffbindende Molekül in den Erythrozyten. Hb besteht aus vier Globinen als Untereinheiten, je 2 Hb alpha (HBA) und Hb Beta (HBB). Hb wird aber nicht nur von Erythrozyten, sondern auch von Zellen des Gehirns, der Lunge, der Niere, des Immunsystems und des Reproduktionstraktes produziert. Der Sauerstoffgehalt hat auf die Entwicklungskompetenz von Oozyten während der *in-vitro* Maturation verschiedene Effekte. Einerseits ist Sauerstoff essentiell für die Maturation der Oozyten, aber auf der anderen Seite können zu hohe Sauerstoffkonzentrationen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species-ROS) führen, welche die Oocyte schädigen können (Cetica et al., 2001; Wrenzycki and Stinshoff, 2013). Die Literatur über den Sauerstoffgehalt während IVM gibt widersprüchliche Resultate unter den Tierarten. Mathematische Modelle über den Sauerstoffgehalt in humanen präovulatorischen Follikeln ergaben Sauerstoffgehalte zwischen 11 und 51 mmHg (1.5%-6.7%) (Redding et al., 2007). Der Sauerstoffgehalt wird durch den an das Hb gebundene Sauerstoff aufrecht gehalten. Das Vorkommen von Hb Molekülen innerhalb des Follikels in Granulosa- und Kumuluszellen ist bereits in der Literatur dokumentiert (Thompson et al., 2015). Es wurden Hb Transkripte ausschliesslich in Kumuluszellen von *in-vivo* maturierten Mäuseoozyten nachgewiesen (Kind

et al., 2013). Brown et al. (2015) zeigten, dass Hämoglobin auf mRNA- und Proteinlevel in Kumuluszellen von *in-vivo* maturierten Mäuse KOK vorkommt, aber nicht in IVM KOK (Brown et al., 2015). In einer anderen Studie wurde HBB in bovinen Oozyten gefunden. Darin konnte gezeigt werden, dass der HBB Gehalt im Laufe der Maturation steigt (Labas et al., 2018). Diese Studien zeigen eine Übereinstimmung mit den Resultaten der vorliegenden Studie, in der Unterheiten des Hb in der *in-vivo* und *in-vitro* Gruppe nachgewiesen wurden. Der Grund, weshalb HBA in der *in-vivo* Gruppe signifikant hochreguliert ist, könnte in der unterschiedlichen Wirkung von LH liegen. Die maturierende Oocyte hat ein grosses Bedürfnis an Sauerstoff für die ATP Produktion durch oxidative Phosphorylierung. Ihre Entwicklungskompetenz ist unter anderem abhängig vom Sauerstofftransport von der Follikelwand durch die Granulosa- und Kumuluszellen bis hin zur Oocyte. Dieser Sauerstofftransport ist unter anderem abhängig von der Stärke der Vaskularisation in der Follikelwand?? (Redding et al., 2007). Sie wird unter anderem über das Signalmolekül hypoxia-induced factor (HIF) reguliert. HIF wird im Zusammenhang mit Hypoxie oder oxidativem Stress vermehrt gebildet (Saha et al., 2014). Es wurden höhere Konzentrationen von HIF in Kumuluszellen gefunden, die in einem niedrigen Sauerstoffmilieu kultiviert wurden, als bei solchen die bei 20% Sauerstoffgehalt während IVM in Kultur waren (Kind et al., 2015). Ist zu wenig Sauerstoff vorhanden, wird HIF aktiviert, was zu vermehrter Synthese von Hb führt. Somit kann mehr Sauerstoff gebunden werden. Die Regulation der Sauerstoffzufuhr im Follikel ist nicht nur hypoxieabhängig, sondern wird auch endokrin gesteuert. So kommt es nach dem LH Peak zu einem signifikanten Anstieg der HIF Aktivität und somit auch von Hämoglobin (Redding et al., 2007). In der vorliegenden Dissertation wurde eben in der *in-vitro* Gruppe HBA in equinem Kumulus gefunden, allerdings in signifikant kleinerer Menge als in der *in-vivo* Gruppe. Da die IVM unter 20% Sauerstoffgehalt durchgeführt wird, kann es sein, dass es *in-vitro* weniger Sauerstoffbindende Hb Moleküle braucht (Thompson et al., 2015). Es ist zu vermuten, dass die Oozyten in der *in-vivo* Gruppe einerseits aus einem gut vaskularisierten sprungreifen Follikel stammen und sie andererseits schon ein LH Signal erhalten haben. Eventuell könnte eine Supplementierung von Hb die Entwicklungskompetenz von equinen Oozyten während der IVM verbessern. Die Theorie, dass es eine Hämoglobinarmut in Kumuluszellen während der IVM gibt, wurde untermauert, als die Zugabe von Ferrohämoglobin (Fe^{2+}) im IVM Medium die Blastozystenrate verbesserte. Dies wurde in der Studie von Brown et al. (2015) gezeigt, in der eine positive Wirkung der Supplementierung von Hb auf das Entwicklungspotential von Mäuseembryonen unter IVM Bedingungen gezeigt werden konnte (Brown et al., 2015). Es müssen weitere Studien durchgeführt werden, um die Rolle von Hb im Rahmen der Maturation als regulierender Faktor für die Oxygenierung der KOK zu untermauern.

7.2.8. Versican core Protein

Das Versican Protein (*Vcan*) ist ein stark exprimiertes hyaluronbindendes Proteoglykan, welches ausgeprägt im Ovar der meisten Spezies vorkommt. Vcan mRNA wurde nach LH Stimulation in Mäusegranulosazellen und in der extrazellulären Matrix von KOK gefunden

(Russell et al., 2003b). Für die Formation der KOK Matrix ist nicht nur die Bildung von Hyaluron nötig, sondern auch etwas, das diese zusammenhält. Dies geschieht unter der Einwirkung von *Vcan* (Russell et al., 2003a). Die Kommunikation über gap junctions zwischen Kumuluszellen untereinander und zwischen Kumuluszellen und der Oozyte sowie ein funktionierender Austausch von Metaboliten innerhalb der Matrix des KOK ist für die Maturation und der Embryogenese von grosser Bedeutung (Zhang et al., 2005). Dunning et. al (2007) konnten zeigen, dass *Vcan* 6h nach hCG Stimulation *in-vivo* KOK von Mäusen hochreguliert war. Unter IVM Bedingungen konnte kein Anstieg von *Vcan* festgestellt werden (Dunning et al., 2007). Dieses Resultat stimmt mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Studie (Abb. 16) überein, in der *Vcan* in der *in-vivo* Gruppe signifikant erhöht ist. Es ist also möglich, dass es *in-vivo* einen erheblichen Stimulus für die Induktion von *Vcan* geben muss, welcher unter *in-vitro* Bedingungen ungenügend ist. Es ist also denkbar, dass *Vcan* für die Kumulusexpansion und Maturation von Oozyten mitverantwortlich ist, indem es die Kumulusmatrix zusammenhält. Zudem könnte *Vcan* als Indikator für die Oozytenqualität unter IVM Bedingungen verwendet werden, wenn dessen Konzentration als Qualitätsmassstab verwendet wird.

7.2.9. Inter-alpha-trypsin inhibitor

Der Inter-alpha-trypsin inhibitor (*ITIH*) ist von der Funktion her ähnlich dem *Vcan*. Es stabilisiert die extrazelluläre Matrix der KOK. Man weiss, dass es direkt das neu gebildete Hyaluron untereinander verknüpft und so die Matrix im KOK stärkt. Dies konnten Chen et al. (1992 mit dem immunozytologischen Nachweis von *ITIH* in Kumuluszellen aus präovulatorischen Mäusefollikeln aufzeigen (Chen et al., 1992). Jessen und Odum konnten mittels gelelektrophoretischen Untersuchungen mit humaner Follikelflüssigkeit die Wichtigkeit von *ITIH* aufzeigen. Sie sehen die Bindung von *ITIH* an Hyaluronsäure als notwendig an für eine normale Expansion des KOK. Das Fehlen von *ITIH* konnte mit vermehrter Infertilität in Zusammenhang gebracht werden (Jessen and Odum, 2003). Weil *ITIH* stabilisiert auf den Kumulus wirkt, wird folglich eine mögliche Rolle von *ITIH* in der Aufnahme des KOK in den Eileiter vermutet. Dies kann daher abgeleitet werden, da *ITIH* in Kumuluszellen von erfolgreich *in-vivo* maturierten KOK vorkommt, aber nicht in erfolgreich *in-vitro* maturierten KOK oder in KOK, die *in-vivo* nicht erfolgreich maturiert wurden (Varani et al., 2002). In unserem Versuch ist *ITIH* in der *in-vivo* Gruppe signifikant erhöht und kann mit der erfolgreichen Maturation der Oozyten dieser Gruppe in Verbindung gebracht werden. Es konnten keine Studien über *ITIH* und dessen Einfluss auf die Maturation von Oozyten bei der Stute gefunden werden. Es müssten zuerst weitere Untersuchungen von *ITIH* durchgeführt werden, um unser Resultat zu bestätigen.

7.3. *In-vitro* hochregulierte Proteine

7.3.1. Fatty acid-binding protein 3

Fatty acid-binding proteins (FABP) sind für die Aufnahme, den Transport und den Metabolismus von Fettsäuren (FA) verantwortlich. Diese Proteine, welche aus dem Zytoplasma stammen und langkettige Fettsäuren sowie andere hydrophobe Substanzen binden, haben eine Rolle in der Modulation des Zellwachstums und der Proliferation von Zellen. Sie wirken zytoprotektiv und sind in allen Körperzellen vorhanden (Zimmermann et al., 1998). Die Synthese von FABPs ist erhöht, wenn es zu einer Zunahme von FA kommt (Sanchez-Lazo et al., 2014). In unserem Versuch war das FABP3 in der *in-vitro* Gruppe erhöht. Es deutet darauf hin, dass vermehrte FA unter *in-vitro* Bedingungen vorkommen. FA sind neben Glukose eine wichtige Energiequelle für die Oozyte. Freie FA kommen in der Follikelflüssigkeit und im intrazellulären Speicher von KOK vor (Leroy et al., 2005). Die Energie aus freien FA wird in den Mitochondrien via β -Oxidation aus FA produziert. Die oxidierten Fettsäuren (FAO) beeinflussen bei Mäuseoozyten nachgewiesenermaßen positiv die Qualität von Oozyten in Bezug auf die Maturations- und Entwicklungskompetenz (Downs et al., 2009). Dasselbe konnte bei Rindern gezeigt werden (Kim et al., 2001). Sanchez et. al (2014) konnten diese Erkenntnisse beim Rind unter IVM Bedingungen bestätigen. Dazu fanden Sie in *in-vivo* und *in-vitro* maturierten bovinen Oozyten einen Unterschied in der Expression von FA codierenden Genen. Die signifikante Erhöhung von FABP3 in unserem Versuch deutet auf ein vermehrtes Vorkommen von FA hin und somit zu einer vermehrten FAO. Möglicherweise hat es im TCM199 zu viel Glucose, was zu Pyruvat und dann zu FA umgewandelt wird. Vielleicht gibt es einen „point of no return“, an dem die überschüssigen FA nicht mehr aufgenommen werden können. Diese Hypothese müsste allerdings mit verschiedenen Medien bzw. Glukosekonzentrationen untersucht werden.

7.3.2. Secreted frizzled-related protein 4

Es ist klar, dass verschiedene Proteine in den Mechanismus der Signalkaskade für die folliculäre Entwicklung eingreifen. Dazu gehört beispielsweise die Familie der „transforming growth factors“, der Insulin-like growth factor, die Proteinkinase C und das Signalprotein Wnt. Letzteres spielt eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit dem Secreted frizzled-related protein (SFRP4). Wnt agiert durch die Bindung von SFRP4 und wirkt durch seinen Einfluss am Zellzyklus proliferierend, differenzierend und apoptotisch (Maman et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass vor allem bei der Anbildung eines Gelbkörpers die Expression von SFRP4 hochreguliert ist (Guo et al., 1998). Das erstaunt nicht, wenn man sich die rasche Anbildung eines Gelbkörpers vorstellt.

Bei Betrachtung des zyklischen Ovars wird ersichtlich, dass auch die Apoptose dabei allgegenwärtig ist. In einer Studie von Maman et. al (2011) wurde erstmals das Vorkommen von SFR-Proteinen in humanen Granulosazellen gezeigt. Dabei war SFRP4 in den Granulosazellen von Antralfollikeln in hohen Konzentrationen nachweisbar. Demgegenüber ist SFRP4 in der präovulatorischen Phase nur in geringen Mengen vorhanden. Sie konnten weiter aufzeigen, dass dieses Protein eine inverse Korrelation zur Maturität von Oozyten hat.

So ist die Expression in Kumuluszellen von MII Oozyten am tiefsten. Diese Herunterregulation von SRFP4 in der präovulatorischen Phase konnte auf die Wirkung von LH zurückgeführt werden (Maman et al., 2011). Diese Erkenntnisse bestätigen unsere Ergebnisse bei equinen Kumuluszellen. Das SRFP4 ist bei unserem Versuch in der *in-vitro* Gruppe hochreguliert (Abb.23). Da SFRP4 bei der Anbildung eines Gelbkörpers in grossen Mengen vorkommt, bei der eine vermehrte Apoptose der Granulosa- und Kumuluszellen stattfindet, könnte davon ausgegangen werden, dass es unter IVM Bedingungen aufgrund der Hochregulation von SFRP4 ebenfalls zu vermehrter Apoptose kommt. Dies wiederum hätte einen direkten Einfluss auf die schlechtere Entwicklungskompetenz der Oozyten bei IVM. In der *in-vivo* Gruppe ist SFRP4 nicht hochreguliert, was mit dieser Argumentation bedeutet, dass es weniger Apoptose gibt. Mit dieser Überlegung würde sich die makroskopisch schlechtere Qualität der Kumuluszellen in der *in-vitro* Gruppe erklären lassen. Dies äusserte sich in Form von wenig expandiertem und in seiner Erscheinung eher kompaktem Kumulus. Da in der *in-vivo* Gruppe SRFP4 in kleineren Mengen vorkommt, kann man annehmen, dass die Kumuluszellen *in-vitro* schneller in Apoptose gehen. Somit könnte unter Umständen die Zeit eine limitierende Rolle in der Weiterverarbeitung der KOK für die IVM spielen. Zudem wäre SFRP4 damit ein weiterer möglicher Marker für die Maturationskompetenz der KOK in der IVM, falls sich in weiteren Studien zeigen sollte, dass die Menge an SFRP4 mit der Kumulusapoptose und damit mit der Maturation korreliert.

7.3.3. Matrix metalloproteinase-19 und Hitzeschock

Metalloproteinasen (MMP) sind eine Gruppe verwandter Enzyme, welche die Spaltung von Peptidbindungen von Proteinen katalysieren. Sie sind ausserhalb von Zellen in der extrazellulären Matrix lokalisiert, die sie im aktivierten Zustand abbauen können. Dies ist Teil des Gewebeumbaus, der bei verschiedenen biologischen Prozessen, wie der Wundheilung, dem Tumorstadium oder der Embryogenese vorkommt (Ravanti and Kahari, 2000). Somit ist auch sein Vorkommen im zyklischen Ovar bzw. in den Kumuluszellen nachvollziehbar. In unserem Versuch ist als Vertreter der MMP die Matrix metalloproteinase-19 in der *in-vitro* Gruppe signifikant erhöht. MMP sind bereits gut untersuchte Proteine in der assistierten Reproduktion. Insbesondere die Metalloproteinase-9 (MMP9) scheint einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklungskompetenz von bovinen Oozyten zu haben. Es wurde beim Rind gezeigt, dass MMP9 exklusiv in Kumuluszellen vorkommt (Regassa et al., 2011). Es ist verantwortlich für die Expansion der Kumuluszellen, indem es Hyaluronsäure bindet und den Wachstumsfaktor transforming growth factor- β in seine aktive Form spaltet (Rispoli et al., 2013). Ein vermehrtes Vorkommen von MMP9 in KOK ist mit einer erfolgreichen Fertilisation und mit einer erhöhten Entwicklungsrate von Blastozysten assoziiert. MMP9 wurde somit als Marker für die Entwicklungskompetenz von bovinen Oozyten identifiziert (Robert et al., 2001). Interessante Versuche haben gezeigt, dass Hitzestress, insbesondere unter IVM Bedingungen, die Bildung von MMP9 reduziert. Somit ist auch die Entwicklungskompetenz von Oozyten beeinträchtigt. Bei KOK von Rindern wurde gezeigt, dass unter Hitzestress (2.5°C über der normalen Körpertemperatur), die Produktion von

Hyaluron und die Expansion von Kumuluszellen beeinträchtigt ist (Lenz et al., 1983). Die Kumuluszellen und deren Verbindung zur Oozyte via Gap-junctions werden für eine normale Maturation benötigt. Eine Reduktion von MMP9 durch Hitzestress scheint eine plausible Erklärung für eine schlechtere Entwicklungskompetenz unter IVM Bedingungen zu sein, da die Expansion der Kumuluszellen inhibiert wird (Rispoli et al., 2013). Eine weitere zusätzliche Wirkung von Hitzestress auf die Oozyte ist die vermehrte Bildung von Progesteron. Es wurde gezeigt, dass Progesteron eine zusätzliche Hemmung von MMP9 bewirkt (Imada et al., 1997).

Es konnte nachgewiesen werden, dass *in-vitro* maturierte KOK eine Hochregulierung der Matrix metalloproteinase-19 (MMP19) zeigen (Abb. 24). Angenommen, dass MMP19 in equinen Oozyten, eine ähnliche Wirkung wie MMP9 bei bovinen Oozyten hat, so könnte MMP19 bei equinen Oozyten mit einer positiven Entwicklungskompetenz *in-vitro* korrelieren. Die bei uns gemessenen Kumuluszellen stammen alle von Oozyten, welche eine erfolgreiche IVM durchgemacht haben. Somit würde sich die Hochregulation von MMP19 in der *in-vitro* Gruppe erklären lassen. Aufgrund unseres Versuchsaufbaus lässt sich über die weitere Entwicklungskompetenz keine Aussage machen, da die Oozyten nach erfolgreicher IVM nicht fertilisiert wurden. Die weitere Entwicklungskompetenz im Zusammenhang mit MMP19 wäre somit ein interessanter Ansatz für weitere Studien.

7.3.4. Heatshock protein70-binding protein

Ein weiteres Protein, welches in den Zusammenhang mit Hitzeschock gebracht wird, ist das heatshock protein70-binding protein (Hsp70). Wie es der Name sagt, bindet es das Hitzeschockprotein 70. Hsp70 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Hitzeschockantwort, wirkt antiapoptotisch und hat unter anderem einen positiven Einfluss auf die Entwicklungskapazität von Oozyten (Neuer et al., 1998). Hsp70 ist erforderlich für eine effiziente Proteinfaltung im Zytoplasma und katalysiert den Nukleotidaustausch bei der RNA Synthese (Shomura et al., 2005). In unserem Versuch ist Hsp70bp in der *in-vitro* Gruppe hochreguliert (Abb. 25). Hsp70 spielt, wie das MMP9, eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung. Wie das MMP9, hat eine Erhöhung von Hsp70, eine positive Wirkung auf das Embryonalwachstum. Eine erhöhte Konzentration von Hsp70 führt bei Mäusen zu einer besseren Blastozystenrate (Neuer et al., 1998). Es wurde nachgewiesen, dass Hsp70 für die Vollendung der Meiose II notwendig ist und dass die Bindung zwischen Spermium und Zona pellucida signifikant verbessert wird. In der gleichen Studie wurde die Präsenz von Hsp70 Antikörpern in Kulturmedien mit vermehrter Apoptose und schlechter Blastozystenbildung assoziiert (Matwee et al., 2001). So konnte nachgewiesen werden, dass es antiapoptotisch wirkt. Unter vermehrter Hitzebelastung wird Hsp70 vermehrt gebildet. Man kann daraus schliessen, dass es eine protektive Wirkung auf die Oozyte ausübt. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die vermehrte Produktion von Hitzeschockproteinen, wie dem Hsp70, eine normale Embryonalentwicklung unter suboptimalen Bedingungen begünstigt. Diese Behauptung scheint insofern plausibel zu sein, weil auch bei unserem Versuch eine Erhöhung von Hsp70bp, zu einer erfolgreichen Maturation *in-vitro*,

beziehungsweise zu einer Vollendung der Meiose II geführt hat. Interessant wäre zu sehen, in welcher Menge Hsp70 in KOK von Oozyten vorkommt, welche die Metaphase II nicht erreicht haben.

7.3.5. Serpin B6

Serpine sind Serinprotease-Inhibitoren, und gehören zur Familie der Plasminogenaktivatoren (PA). PA sind mit vielen Prozessen im Reproduktionstrakt assoziiert, wie z.B. Ovulation oder Embryonalentwicklung und –implantation (Vassalli et al., 1991a). Es gibt hunderte identifizierte Serpine, welche alle dieselbe Grundstruktur aufweisen, sich aber in kleinen Peptidvariationen unterscheiden. Somit wirken auch nicht alle Serpine auf die gleiche Weise inhibitorisch. Es gibt Serpine, welche eine kompetitive Hemmung (Schlüssel-Schloss-Prinzip) von Proteasen bewirken und solche die durch Konformationsänderungen der Zielprotease inhibitorisch wirken. Serpin B6 kommt, auf den Reproduktionstrakt bezogen, vermehrt im Eileiter vor, daneben aber auch in Endothelzellen, Epithelzellen, und in den endokrinen Organen Pankreas und Niere (Vassalli et al., 1991b). In unserem Versuch war Serpin B6 bei den *in-vitro* maturierten KOK signifikant hochreguliert, womit sein Vorkommen in Kumuluszellen bei der Stute nachgewiesen werden konnte. Vermehrt wird Serpin B6 auch von Mastzellen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten gebildet. Es wird vermutet, dass Serpin B6 in diesen Zellen durch die Inhibition von lysosomalen Proteasen den vorzeitigen Zelluntergang verhindert. Serpine wurden in humanen Kumuluszellen nachgewiesen. Es wurden dabei höhere Serpin 2 Konzentrationen in kompakten humanen Kumuluszellen festgestellt als in expandierten (Devjak et al., 2012). Hohe Serpin E2 Konzentrationen sind also mit unreifen KOK zu assoziieren. Analoges konnte auch bei Kumuluszellen von Mäusen gezeigt werden (Lu et al., 2013). Serpin E2 kann somit als Indikator für unreife Kumuluszellen verwendet werden. Eine vermehrte Konzentration von Serpin E2 führte zu einer verminderten Produktion von Vcan und einer Erniedrigung der Konzentration von Hyaluron in der Kumulusmatrix. Dies führt zu einer supprimierten Kumulusexpansion und damit auch zu einer ausbleibenden Maturation von Oozyten (Lu et al., 2013). Es ist denkbar, dass Serpin B6 eine ähnliche Funktion wie Serpin 2 hat. Die KOK von den *in-vitro* maturierten Oozyten waren makroskopisch nicht gleich deutlich expandiert wie die *in-vivo* maturierten; zeigten vereinzelt sogar kompakte Erscheinungsformen (Abb. 8). Allerdings haben alle Oozyten einen Polkörper entwickelt und somit die Maturation beendet. Die Verbindung zu Vcan liefert eine mögliche Erklärung für die „bessere“ Expansion der KOK bei den *in-vivo* maturierten Oozyten. Vcan ist ein hyaluronbindendes Proteoglykan, welches die extrazelluläre Matrix der KOK zusammenhält und für die Kumulusexpansion mitverantwortlich ist. Es kann davon ausgegangen werden, dass Serpin B6, analog zum Serpin 2, die Bildung von Vcan inhibiert. Somit ist bei einer Hochregulation von Serpin B6 *in-vitro* eine schlechtere Kumulusexpansion zu erklären. Ein möglicher Ansatz für die Verbesserung von IVM Ergebnissen wäre eine Hemmung von Serpin B6. Dies könnte beispielsweise mit Antikörpern gegen Serpin B6 geschehen. Das Vorkommen von Serpin B6 in Kumuluszellen von Stuten wurde bisher nicht in der einschlägigen Literatur dokumentiert.

7.4. Schlussfolgerung

In dieser Dissertation war die Zielsetzung, das Proteom von equinen Kumuluszellen aus *in-vivo* und *in-vitro* maturierten KOK zu vergleichen. Die unterschiedlichen Maturationsbedingungen sorgten für die Hochregulation von verschiedenen Proteinen in den beiden Gruppen. Von den insgesamt 2060 detektierten Proteinen waren 242 unterschiedlich exprimiert, wovon 102 Proteine in der *in-vivo* Gruppe und 140 Proteine in der *in-vitro* Gruppe hochreguliert waren. Gemäss unserem Wissensstand und ausführlicher Literaturrecherche ist es die erste Arbeit, in der eine Proteomik Analyse von Pferdekumulus durchgeführt wurde. Diskutiert wurden jene hochregulierten Proteine, welche aus biologischer Sicht als besonders interessant betrachtet wurden. In der *in-vivo* Gruppe konnten dank der Enrichment Analyse 22 Proteine in die biologische Gruppe „Komplement- und Koagulationskaskade“ eingeteilt werden. Es ist bekannt, dass das Komplementsystem als Teil des innate Immunsystems in der Reproduktion eine wichtige Rolle spielt. Dies konnte mit der Hochregulation von wichtigen Faktoren wie beispielsweise der Komplement C3, Fibrinogen, und Antithrombin-III in der *in-vivo* Gruppe bestätigt werden. Es sind alle Faktoren, welche an der Ovulation beteiligt sind und die Maturation positiv beeinflussen. Vor allem Komplement C3 könnte zukünftig ein vielversprechendes Protein bei der Stute für die IVF sein. Mit einem potentiell positiven Einfluss auf die IVM und der Rolle in der Interaktion zwischen Spermium und Oozyte bietet es sich an, um seine Rolle im Rahmen von Ovulation und Fertilisation weiter zu charakterisieren. Weitere, neue Erkenntnisse aus der Gruppe der *in-vivo* hochregulierten Proteinen, wie beispielsweise das Vorkommen von CRISP in Kumuluszellen oder die Abhängigkeit von ZP3R vom Komplementsystem, geben neue Ideen für zukünftige Versuchsansätze.

Die Kumuluszellen aus der *in-vitro* Gruppe waren insgesamt weniger deutlich expandiert und inhomogen in ihrem Verteilungsmuster, was auf Zellschädigungen hindeutet. Dies widerspiegelt sich auch in den nachgewiesenen Proteinen. Einige von ihnen wirken zytoprotektiv, so wie beispielsweise das FABP oder die MMP. Andere Proteine finden sich in der Literatur im Zusammenhang mit oxidativem Stress, Hitzeschock oder Apoptose. Diesen Themen wurde in der Vergangenheit für *in-vitro* Versuche möglicherweise zu wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Das Hsp70 wirkt protektiv auf Oozyten unter Hitzeschock. Möglicherweise könnte durch dessen Einbezug in IVM Medien die Entwicklungskompetenz der Oozyten verbessert werden.

Über das Vorkommen von Serpin B6 in equinen Kumuluszellen wurde hier das erste Mal berichtet. Die Erkenntnisse aus der Humanmedizin, dass Serpin B2 als Indikatorprotein für unreifen, kompakten Kumulus dienen kann, könnte bei der Stute auf Serpin B6 adaptiert werden. Dazu sind weitere Untersuchungen nötig, welche vielversprechende Rückschlüsse auf den Reifegrad von Oozyten liefern könnten.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Accogli, G., Douet, C., Ambruosi, B., Martino, N.A., Uranio, M.F., Deleuze, S., Dell'Aquila, M.E., Desantis, S., Goudet, G., 2014. Differential Expression and Localization of Glycosidic Residues in In Vitro- and In Vivo-Matured Cumulus-Oocyte Complexes in Equine and Porcine Species. *Molecular Reproduction and Development* 81, 1115-1135.
- Al-Anzi, B., Chandler, D.E., 1998. A sperm chemoattractant is released from *Xenopus* egg jelly during spawning. *Developmental biology* 198, 366-375.
- Al-Edani, T., Assou, S., Ferrieres, A., Deutsch, S.B., Gala, A., Lecellier, C.H., Ait-Ahmed, O., Hamamah, S., 2014. Female Aging Alters Expression of Human Cumulus Cells Genes that Are Essential for Oocyte Quality. *Biomed Res Int*.
- Albertini, D.F., Combelles, C.M., Benecchi, E., Carabatsos, M.J., 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 121, 647-653.
- Alm, H., Torner, H., Kanitz, W., Becker, F., Hinrichs, K., 1997. Comparison of different methods for the recovery of horse oocytes. *Equine veterinary journal. Supplement*, 47-50.
- Anderson, D.J., Abbott, A.F., Jack, R.M., 1993. The role of complement component C3b and its receptors in sperm-oocyte interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10051-10055.
- Angelucci, S., Ciavardelli, D., Di Giuseppe, F., Eleuterio, E., Sulpizio, M., Tiboni, G.M., Giampietro, F., Palumbo, P., Di Ilio, C., 2006. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1764, 1775-1785.
- Barbacini, S., Zavaglia, G., Gulden, P., Marchi, V., Necchi, D., 2000. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. *Equine Vet Educ* 12, 312-317.
- Berendt, F.J., Fröhlich, T., Bolbrinker, P., Boelhaue, M., Güngör, T., Habermann, F.A., Wolf, E., Arnold, G.J., 2009. Highly sensitive saturation labeling reveals changes in abundance of cell cycle-associated proteins and redox enzyme variants during oocyte maturation in vitro. *Proteomics* 9, 550-564.
- Betteridge, K.J., Flechon, J.E., 1988. The Anatomy and Physiology of Pre-Attachment Bovine Embryos. *Theriogenology* 29, 155-187.
- Bianchi, M.E., 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukocyte Biol* 81, 1-5.
- Biggers, J.D., Whittingham, D.G., Donahue, R.P., 1967. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58, 560-567.
- Bleil, J.D., Wassarman, P.M., 1980. Mammalian Sperm-Egg Interaction - Identification of a Glycoprotein in Mouse Egg Zona Pellucida Possessing Receptor Activity for Sperm. *Cell* 20, 873-882.
- Bleil, J.D., Wassarman, P.M., 1988. Galactose at the Nonreducing Terminus of O-Linked Oligosaccharides of Mouse Egg Zona Pellucida Glycoprotein Zp3 Is Essential for the Glycoproteins Sperm Receptor Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 6778-6782.
- Boutz, D.R., Horton, A.P., Wine, Y., Lavinder, J.J., Georgiou, G., Marcotte, E.M., 2014. Proteomic identification of monoclonal antibodies from serum. *Anal Chem* 86, 4758-4766.
- Brown, H.M., Anastasi, M.R., Frank, L.A., Kind, K.L., Richani, D., Robker, R.L., Russell, D.L., Gilchrist, R.B., Thompson, J.G., 2015. Hemoglobin: a gas transport molecule that is hormonally regulated in the ovarian follicle in mice and humans. *Biol Reprod* 92, 26.

- Brown, H.M., Dunning, K.R., Sutton-McDowall, M., Gilchrist, R.B., Thompson, J.G., Russell, D.L., 2017. Failure to launch: aberrant cumulus gene expression during oocyte in vitro maturation. *Reproduction* 153, R109-R120.
- Brukman, N.G., Miyata, H., Torres, P., Lombardo, D., Caramelo, J.J., Ikawa, M., Da Ros, V.G., Cuasnicu, P.S., 2016. Fertilization defects in sperm from Cysteine-rich secretory protein 2 (Crisp2) knockout mice: implications for fertility disorders. *Mol Hum Reprod* 22, 240-251.
- Buccione, R., Vanderhyden, B.C., Caron, P.J., Eppig, J.J., 1990. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol* 138, 16-25.
- Budzikiewicz, H., Grigsby, R.D., 2006. Mass spectrometry and isotopes: A century of research and discussion. *Mass Spectrometry Reviews* 25, 146-157.
- Bundgaard, L., Jacobsen, S., Sorensen, M.A., Sun, Z., Deutsch, E.W., Moritz, R.L., Bendixen, E., 2014. The Equine PeptideAtlas: a resource for developing proteomics-based veterinary research. *Proteomics* 14, 763-773.
- Carnevale, E.M., 2008. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology* 69, 23-30.
- Cavill, R., Sidhu, J.K., Kilarski, W., Javerzat, S., Hagedorn, M., Ebbels, T.M., Bikfalvi, A., Keun, H.C., 2010. A combined metabolomic and transcriptomic approach to investigate metabolism during development in the chick chorioallantoic membrane. *Journal of proteome research* 9, 3126-3134.
- Cetica, P.D., Pintos, L.N., Dalvit, G.C., Beconi, M.T., 2001. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB life* 51, 57-64.
- Chen, L., Mao, S.J.T., Larsen, W.J., 1992. Identification of a Factor in Fetal Bovine Serum That Stabilizes the Cumulus Extracellular-Matrix - a Role for a Member of the Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Family. *J Biol Chem* 267, 12380-12386.
- Choi, Y.H., Chung, Y.G., Walker, S.C., Westhusin, M.E., Hinrichs, K., 2003. In vitro development of equine nuclear transfer embryos: effects of oocyte maturation media and amino acid composition during embryo culture. *Zygote* 11, 77-86.
- Choi, Y.H., Gustafson-Seabury, A., Velez, I.C., Hartman, D.L., Bliss, S., Riera, F.L., Roldan, J.E., Chowdhary, B., Hinrichs, K., 2010. Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Reproduction* 140, 893-902.
- Choi, Y.H., Love, C.C., Varner, D.D., Hinrichs, K., 2006a. Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze-thaw cycles. *Theriogenology* 65, 808-819.
- Choi, Y.H., Love, L.B., Varner, D.D., Hinrichs, K., 2006b. Blastocyst development in equine oocytes with low meiotic competence after suppression of meiosis with roscovitine prior to in vitro maturation. *Zygote* 14, 1-8.
- Choi, Y.H., Love, L.B., Varner, D.D., Hinrichs, K., 2007. Effect of holding technique and culture drop size in individual or group culture on blastocyst development after ICSI of equine oocytes with low meiotic competence. *Anim Reprod Sci* 102, 38-47.
- Conti, M., Hsieh, M., Park, J.Y., Su, Y.Q., 2006. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol* 20, 715-723.
- Cox, L., Vanderwall, D.K., Parkinson, K.C., Sweat, A., Isom, S.C., 2015. Expression profiles of select genes in cumulus-oocyte complexes from young and aged mares. *Reprod Fert Develop* 27, 914-924.

- Cuervo-Arango, J., Newcombe, J.R., 2008. Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. *Theriogenology* 69, 681-687.
- Cushman, M., Glynn, R.J., Goldhaber, S.Z., Moll, S., Bauer, K.A., Deitcher, S., Shrivastava, S., Ridker, P.M., 2006. Hormonal factors and risk of recurrent venous thrombosis: the Prevention of Recurrent Venous Thromboembolism trial. *J Thromb Haemost* 4, 2199-2203.
- Da Ros, V.G., Munoz, M.W., Battistone, M.A., Brukman, N.G., Carvajal, G., Curci, L., Gomez-Elias, M.D., Cohen, D.J., Cuasnicu, P.S., 2015. From the epididymis to the egg: participation of CRISP proteins in mammalian fertilization. *Asian journal of andrology* 17, 711-715.
- da Silveira, J.C., Veeramachaneni, D.N., Winger, Q.A., Carnevale, E.M., Bouma, G.J., 2012. cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biol Reprod* 86, 71.
- Dalbies-Tran, R., Mermillod, P., 2003. Use of heterologous complementary DNA array screening to analyze bovine oocyte transcriptome and its evolution during in vitro maturation. *Biology of Reproduction* 68, 252-261.
- Daviss, B., 2005. Growing pains for metabolomics. *Scientist* 19, 25-28.
- Deanesly, R., 1975. Germ-Cell Development and Meiotic Prophase in Fetal Horse Ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 547-&.
- Dell'Aquila, M.E., Albrizio, M., Guaricci, A.C., De Santis, T., Maritato, F., Tremoleda, J.L., Colenbrander, B., Guerra, L., Casavola, V., Minoia, P., 2008. Expression and localization of the mu-opioid receptor (MOR) in the equine cumulus-oocyte complex and its involvement in the seasonal regulation of oocyte meiotic competence. *Mol Reprod Dev* 75, 1229-1246.
- Dell'Aquila, M.E., Caillaud, M., Maritato, F., Martoriati, A., Gerard, N., Aiudi, G., Minoia, P., Goudet, G., 2004. Cumulus expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 44.
- Desantis, S., Ventriglia, G., Zizza, S., De Santis, T., Di Summa, A., De Metrio, G., Dell'aquila, M.E., 2009. Lectin-binding sites in isolated equine cumulus-oocyte complexes: differential expression of glycosidic residues in complexes recovered with compact or expanded cumulus. *Theriogenology* 72, 300-309.
- Devjak, R., Tacer, K.F., Juvan, P., Klun, I.V., Rozman, D., Bokal, E.V., 2012. Cumulus Cells Gene Expression Profiling in Terms of Oocyte Maturity in Controlled Ovarian Hyperstimulation Using GnRH Agonist or GnRH Antagonist. *PloS one* 7.
- Doan, R., Cohen, N., Harrington, J., Veazey, K., Juras, R., Cothran, G., McCue, M.E., Skow, L., Dindot, S.V., 2013. Identification of copy number variants in horses (vol 22, pg 899, 2012). *Genome research* 23, 1362-1362.
- Donadeu, F.X., Pedersen, H.G., 2008. Follicle development in mares. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2, 224-231.
- Donadeu, F.X., Watson, E.D., 2007. Seasonal changes in ovarian activity: Lessons learnt from the horse. *Animal Reproduction Science* 100, 225-242.
- Donahue, R.P., Stern, S., 1968. Follicular cell support of oocyte maturation: production of pyruvate in vitro. *J Reprod Fertil* 17, 395-398.

- Dong, J., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T.R., Lu, N., Matzuk, M.M., 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383, 531-535.
- Downs, S.M., Humpherson, P.G., Leese, H.J., 2002. Pyruvate utilization by mouse oocytes is influenced by meiotic status and the cumulus oophorus. *Mol Reprod Dev* 62, 113-123.
- Downs, S.M., Mosey, J.L., Klinger, J., 2009. Fatty Acid Oxidation and Meiotic Resumption in Mouse Oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 76, 844-853.
- Driancourt, M.A., 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55, 1211-1239.
- Driancourt, M.A., Mariana, J.C., Palmer, E., 1982. Effect of the stage of the oestrous cycle on the follicular population in pony mares. *Reprod Nutr Dev* 22, 803-812.
- Dunning, K.R., Lane, M., Brown, H.M., Yeo, C., Robker, R.L., Russell, D.L., 2007. Altered composition of the cumulus-oocyte complex matrix during in vitro maturation of oocytes. *Human reproduction* 22, 2842-2850.
- Eppig, J., Schimenti, J., Libby, B., De La Fuente, R., Viveiros, M., 2001. Meiosis in the female mouse: Lessons learned from meiotic abnormalities. *Biology of Reproduction* 64, 100-100.
- Eppig, J.J., 1976. Analysis of mouse oogenesis in vitro. Oocyte isolation and the utilization of exogenous energy sources by growing oocytes. *J Exp Zool* 198, 375-382.
- Eppig, J.J., 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction, fertility, and development* 8, 485-489.
- Fagundes, N.S., Lacerda, V.A.M., Caixeta, E.S., Machado, G.M., Melo, E.D., Rumpf, R., Dode, M.A.N., Franco, M.M., 2010. Methylation Pattern of a Differentially Methylated Region Located in the Last Exon of the Igf2 Gene in Oocytes from Nellore Cows. *Reprod Fert Develop* 22, 283-283.
- Fahiminiya, S., Labas, V., Dacheux, J.L., Gerard, N., 2011a. Improvement of 2D-PAGE resolution of human, porcine and equine follicular fluid by means of hexapeptide ligand library. *Reprod Domest Anim* 46, 561-563.
- Fahiminiya, S., Labas, V., Roche, S., Dacheux, J.L., Gerard, N., 2011b. Proteomic analysis of mare follicular fluid during late follicle development. *Proteome science* 9, 54.
- Fair, T., 2010. Mammalian oocyte development: checkpoints for competence. *Reproduction, fertility, and development* 22, 13-20.
- Familiari, G., Verlengia, C., Nottola, S.A., Renda, T., Micara, G., Aragona, C., Zardi, L., Motta, P.M., 1996. Heterogeneous distribution of fibronectin tenascin-c, and laminin immunoreactive material in the cumulus-corona cells surrounding mature human oocytes from IVF-ET protocols - Evidence that they are composed of different subpopulations: An immunohistochemical study using scanning confocal laser and fluorescence microscopy. *Molecular Reproduction and Development* 43, 392-402.
- Fan, H.Y., Sun, Q.Y., 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 70, 535-547.
- Ferreira, E.M., Vireque, A.A., Adona, P.R., Meirelles, F.V., Ferriani, R.A., Navarro, P.A., 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 71, 836-848.
- Fortune, J.E., 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 50, 225-232.
- Fortune, J.E., Rivera, G.M., Yang, M.Y., 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci* 82-83, 109-126.

- Galli, C., Duchi, R., Colleoni, S., Lagutina, I., Lazzari, G., 2014. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* 81, 138-151.
- Galli, C., Lagutina, I., Duchi, R., Colleoni, S., Lazzari, G., 2008. Somatic cell nuclear transfer in horses. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2, 331-337.
- Garfin, D.E., 2003. Two-dimensional gel electrophoresis: an overview. *Trac-Trend Anal Chem* 22, 263-272.
- Gastal, E.L., Gastal, M.O., Beg, M.A., Ginther, O.J., 2004. Interrelationships among follicles during the common-growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. *Reproduction* 128, 417-422.
- Gastal, E.L., Gastal, M.O., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., 2000. Follicle selection in mares: Role of luteinizing hormone. *Biology of Reproduction* 62, 225-225.
- Gastal, E.L., Silva, L.A., Gastal, M.O., Evans, M.J., 2006. Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares. *Animal Reproduction Science* 94, 186-190.
- Georgiou, A.S., Gil, M.A., Alminana, C., Cuello, C., Vazquez, J.M., Roca, J., Martinez, E.A., Fazeli, A., 2011. Effects of complement component 3 derivatives on pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reprod Domest Anim* 46, 1017-1021.
- Gerard, N., Fahiminiya, S., Grupen, C.G., Nadal-Desbarats, L., 2015. Reproductive Physiology and Ovarian Folliculogenesis Examined via H-1-NMR Metabolomics Signatures: A Comparative Study of Large and Small Follicles in Three Mammalian Species (*Bos taurus*, *Sus scrofa domestica* and *Equus ferus caballus*). *Omics* 19, 31-40.
- Gibbs, G.M., Roelants, K., O'Bryan, M.K., 2008. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocrine reviews* 29, 865-897.
- Gilchrist, R.B., Mottershead, D.G., Thompson, J.A., 2011. Oocyte Maturation and Ovulation - An Orchestral Symphony of Signalling. *Australian Biochemist* 42, 8-11.
- Gilchrist, R.B., Ritter, L.J., Armstrong, D.T., 2004. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 82-83, 431-446.
- Gilchrist, R.B., Ritter, L.J., Myllymaa, S., Kaivo-Oja, N., Dragovic, R.A., Hickey, T.E., Ritvos, O., Mottershead, D.G., 2006. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *Journal of cell science* 119, 3811-3821.
- Gilchrist, R.B., Thompson, J.G., 2007. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* 67, 6-15.
- Ginther, O.J., Beg, M.A., Donadeu, F.X., Bergfelt, D.R., 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science* 78, 239-257.
- Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Beg, M.A., 2007a. Incidence, endocrinology, vascularity, and morphology of hemorrhagic anovulatory follicles in mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 27, 130-139.
- Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Bergfelt, D.R., Baerwald, A.R., Pierson, R.A., 2004a. Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women. *Biology of Reproduction* 71, 1195-1201.
- Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Bergfelt, D.R., Baerwald, A.R., Pierson, R.A., 2004b. Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women. *Biol Reprod* 71, 1195-1201.

- Ginther, O.J., Utt, M.D., 2004. Doppler ultrasound in equine reproduction: Principles, techniques, and potential. *Journal of Equine Veterinary Science* 24, 516-526.
- Ginther, O.J., Utt, M.D., Beg, M.A., 2007b. Follicle deviation and diurnal variation in circulating hormone concentrations in mares. *Animal Reproduction Science* 100, 197-203.
- Gittens, J.E., Kidder, G.M., 2005. Differential contributions of connexin37 and connexin43 to oogenesis revealed in chimeric reaggregated mouse ovaries. *J Cell Sci* 118, 5071-5078.
- Gong, X.H., Dubois, D.H., Miller, D.J., Shur, B.D., 1995. Activation of a G-Protein Complex by Aggregation of Beta-1,4-Galactosyltransferase on the Surface of Sperm. *Science* 269, 1718-1721.
- Goossens, K., Van Soom, A., Van Zeveren, A., Favoreel, H., Peelman, L.J., 2009. Quantification of Fibronectin 1 (FN1) splice variants, including two novel ones, and analysis of integrins as candidate FN1 receptors in bovine preimplantation embryos. *Bmc Dev Biol* 9.
- Grondahl, C., Hyttel, P., Grondahl, M.L., Eriksen, T., Gotfredsen, P., Greve, T., 1995. Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation in vivo. *Mol Reprod Dev* 42, 94-105.
- Grondahl, M.L., Andersen, C.Y., Bogstad, J., Borgbo, T., Boujida, V.H., Borup, R., 2012. Specific genes are selectively expressed between cumulus and granulosa cells from individual human pre-ovulatory follicles. *Molecular human reproduction* 18, 572-584.
- Guerrera, I.C., Kleiner, O., 2005. Application of mass spectrometry in proteomics. *Bioscience reports* 25, 71-93.
- Guo, K., Wolf, V., Dharmarajan, A.M., Feng, Z.W., Bielke, W., Saurer, S., Friis, R., 1998. Apoptosis-associated gene expression in the corpus luteum of the rat. *Biology of Reproduction* 58, 739-746.
- Hamamah, S., Matha, V., Berthenet, C., Anahory, T., Loup, V., Dechaud, H., Hedon, B., Fernandez, A., Lamb, N., 2006. Comparative protein expression profiling in human cumulus cells in relation to oocyte fertilization and ovarian stimulation protocol. *Reproductive biomedicine online* 13, 807-814.
- Hardy, D.M., Oda, M.N., Friend, D.S., Huang, T.T., Jr., 1991. A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction. *The Biochemical journal* 275 (Pt 3), 759-766.
- Herrera, C., 2016. Clinical Applications of Preimplantation Genetic Testing in Equine, Bovine, and Human Embryos. *Journal of Equine Veterinary Science* 41, 29-34.
- Herrera, C., Morikawa, M.I., Bello, M.B., Von Meyeren, M., Centeno, J.E., Dufourq, P., Martinez, M.M., Llorente, J., 2014. Setting up equine embryo gender determination by preimplantation genetic diagnosis in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology* 81, 758-763.
- Hill, D.P., Davis, A.P., Richardson, J.E., Corradi, J.P., Ringwald, M., Eppig, J.T., Blake, J.A., 2001. Strategies for biological annotation of mammalian systems: Implementing gene ontologies in mouse genome informatics. *Genomics* 74, 121-128.
- Hinrichs, K., 2010. The equine oocyte: Factors affecting meiotic and developmental competence. *Mol Reprod Dev* 77, 651-661.
- Hinrichs, K., Betschart, R.W., McCue, P.M., Squires, E.L., 2000. Effect of timing of follicle aspiration on pregnancy rate after oocyte transfer in mares. *J Reprod Fertil Suppl*, 493-498.
- Hinrichs, K., Choi, Y.H., Love, L.B., Varner, D.D., Love, C.C., Walckenaer, B.E., 2005. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post

- mortem and relationship to meiotic and developmental competence. *Biol Reprod* 72, 1142-1150.
- Hinrichs, K., Choi, Y.H., Norris, J.D., Love, L.B., Bedford-Guaus, S.J., Hartman, D.L., Velez, I.C., 2012. Evaluation of foal production following intracytoplasmic sperm injection and blastocyst culture of oocytes from ovaries collected immediately before euthanasia or after death of mares under field conditions. *Javma-J Am Vet Med A* 241, 1070-1074.
- Hinrichs, K., Schmidt, A.L., 2000. Meiotic competence in horse oocytes: interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology, and season. *Biol Reprod* 62, 1402-1408.
- Hinrichs, K., Schmidt, A.L., Friedman, P.P., Selgrath, J.P., Martin, M.G., 1993. In vitro maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. *Biol Reprod* 48, 363-370.
- Hinrichs, K., Williams, K.A., 1997. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biol Reprod* 57, 377-384.
- Hipkiss, A.R., 2006. Accumulation of altered proteins and ageing: causes and effects. *Experimental gerontology* 41, 464-473.
- Hohenhaus, M.U., Bostedt, H., 1992. [Double ovulation in mares. Clinical, hormone analytical and sonographic studies]. *Tierarztliche Praxis* 20, 405-409.
- Honda, T., Fujiwara, H., Yoshioka, S., Yamada, S., Nakayama, T., Egawa, M., Nishioka, Y., Takahashi, A., Fujii, S., 2004. Laminin and fibronectin concentrations of the follicular fluid correlate with granulosa cell luteinization and oocyte quality. *Reprod Med Biol* 3, 43-49.
- Imada, K., Ito, A., Sato, T., Namiki, M., Nagase, H., Mori, Y., 1997. Hormonal regulation of matrix metalloproteinase 9 gelatinase B gene expression in rabbit uterine cervical fibroblasts. *Biology of Reproduction* 56, 575-580.
- Janeway, C.A., 2003. How the immune system protects the body from infection. *Biology of Complex Organisms: Creation and Protection of Integrity*, 35-45.
- Jarkovska, K., Martinkova, J., Liskova, L., Halada, P., Moos, J., Rezabek, K., Gadher, S.J., Kovarova, H., 2010. Proteome Mining of Human Follicular Fluid Reveals a Crucial Role of Complement Cascade and Key Biological Pathways in Women Undergoing in Vitro Fertilization. *Journal of proteome research* 9, 1289-1301.
- Jessen, T.E., Odum, L., 2003. Role of tumour necrosis factor stimulated gene 6 (TSG-6) in the coupling of inter-alpha-trypsin inhibitor to hyaluronan in human follicular fluid. *Reproduction* 125, 27-31.
- Johnson, G.R., Kannan, B., Shoyab, M., Stromberg, K., 1993. Amphiregulin induces tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor and p185erbB2. Evidence that amphiregulin acts exclusively through the epidermal growth factor receptor at the surface of human epithelial cells. *J Biol Chem* 268, 2924-2931.
- Juengel, J.L., McNatty, K.P., 2005. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update* 11, 143-160.
- Kall, L., Storey, J.D., MacCoss, M.J., Noble, W.S., 2008. Assigning significance to peptides identified by tandem mass spectrometry using decoy databases. *J Proteome Res* 7, 29-34.
- Kanitz, W., Becker, F., Alm, H., Torner, H., Nurnberg, G., 2003. Ovum pick up in horses: Results and consequences for follicular growth and oocyte quality. *Pferdeheilkunde* 19, 670-+.

- Katz-Jaffe, M.G., Gardner, D.K., 2007. Embryology in the era of proteomics. *Theriogenology* 68 Suppl 1, S125-130.
- Kim, J.Y., Kinoshita, M., Ohnishi, M., Fukui, Y., 2001. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction* 122, 131-138.
- Kim, N.H., Cho, S.K., Choi, S.H., Kim, E.Y., Park, S.P., Lim, J.H., 2000. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation. *Zygote* 8, 25-32.
- Kind, K.L., Banwell, K.M., Gebhardt, K.M., Macpherson, A., Gauld, A., Russell, D.L., Thompson, J.G., 2013. Microarray analysis of mRNA from cumulus cells following in vivo or in vitro maturation of mouse cumulus-oocyte complexes. *Reproduction, fertility, and development* 25, 426-438.
- Kind, K.L., Tam, K.K., Banwell, K.M., Gauld, A.D., Russell, D.L., Macpherson, A.M., Brown, H.M., Frank, L.A., Peet, D.J., Thompson, J.G., 2015. Oxygen-regulated gene expression in murine cumulus cells. *Reproduction, fertility, and development* 27, 407-418.
- Krisher, R.L., 2004. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 82 E-Suppl, E14-23.
- Labas, V., Teixeira-Gomes, A.P., Bouguereau, L., Gargaros, A., Spina, L., Marestaing, A., Uzbekova, S., 2018. Intact cell MALDI-TOF mass spectrometry on single bovine oocyte and follicular cells combined with top-down proteomics: A novel approach to characterise markers of oocyte maturation. *J Proteomics* 175, 56-74.
- Lagutina, I., Lazzari, G., Duchi, R., Colleoni, S., Ponderato, N., Turini, P., Crotti, G., Galli, C., 2005. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction* 130, 559-567.
- Lane, M., Ludwig, T.E., Bavister, B.D., 1999. Phosphate induced developmental arrest of hamster two-cell embryos is associated with disrupted ionic homeostasis. *Mol Reprod Dev* 54, 410-417.
- Leemans, B., Gadella, B.M., Stout, T.A.E., De Schauwer, C., Nelis, H., Hoogewijs, M., Van Soom, A., 2016. Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. *Reproduction* 152, R233-R245.
- Leese, H.J., 1995. Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Hum Reprod Update* 1, 63-72.
- Leese, H.J., Barton, A.M., 1985. Production of pyruvate by isolated mouse cumulus cells. *J Exp Zool* 234, 231-236.
- Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S., Eyestone, W.H., Northey, D.L., First, N.L., 1987. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol Reprod* 36, 376-383.
- Lenz, R.W., Ball, G.D., Leibfried, M.L., Ax, R.L., First, N.L., 1983. In vitro Maturation and Fertilization of Bovine Oocytes Are Temperature-Dependent Processes. *Biology of Reproduction* 29, 173-179.
- Leroy, J.L.M.R., Vanholder, T., Mateusen, B., Christophe, A., Opsomer, G., de Kruif, A., Genicot, G., Van Soom, A., 2005. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 130, 485-495.
- Levesque, J.T., Sirard, M.A., 1995. Effects of different kinases and phosphatases on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 42, 114-121.

- Llanos, R.J., Whitacre, C.M., Miceli, D.C., 2000. Potential involvement of C(3) complement factor in amphibian fertilization. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 127, 29-38.
- Lopez-Ferrer, D., Capelo, J.L., Vazquez, J., 2005. Ultra fast trypsin digestion of proteins by high intensity focused ultrasound. *Journal of proteome research* 4, 1569-1574.
- Love, C.C., Love, L.B., Varner, D.D., Hinrichs, K., 2002. Effect of holding at room temperature on initial chromatin configuration and in vitro maturation rate of equine oocytes. *Theriogenology* 57, 1973-1979.
- Lu, C.H., Lee, R.K.K., Hwu, Y.M., Lin, M.H., Yeh, L.Y., Chen, Y.J., Lin, S.P., Li, S.H., 2013. Involvement of the Serine Protease Inhibitor, SERPINE2, and the Urokinase Plasminogen Activator in Cumulus Expansion and Oocyte Maturation. *PloS one* 8.
- Macaulay, A.D., Gilbert, I., Caballero, J., Barreto, R., Fournier, E., Tossou, P., Sirard, M.A., Clarke, H.J., Khandjian, E.W., Richard, F.J., Hyttel, P., Robert, C., 2014. The Gametic Synapse: RNA Transfer to the Bovine Oocyte. *Biology of Reproduction* 91.
- Maman, E., Yung, Y., Cohen, B., Konopnicki, S., Dal Canto, M., Fadini, R., Kanety, H., Kedem, A., Dor, J., Hourvitz, A., 2011. Expression and regulation of sFRP family members in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 17, 399-404.
- Martino, N.A., Dell'Aquila, M.E., Filioli Uranio, M., Rutigliano, L., Nicassio, M., Lacalandra, G.M., Hinrichs, K., 2014. Effect of holding equine oocytes in meiosis inhibitor-free medium before in vitro maturation and of holding temperature on meiotic suppression and mitochondrial energy/redox potential. *Reprod Biol Endocrinol* 12, 99.
- Matwee, C., Kamaruddin, M., Betts, D.H., Basrur, P.K., King, W.A., 2001. The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. *Molecular human reproduction* 7, 829-837.
- McReynolds, S., Dzieciatkowska, M., Hansen, K.C., Schoolcraft, W.B., Katz-Jaffe, M.G., 2011. Impact of Maternal Age on the Human Cumulus Cell Proteome. *Biology of Reproduction* 85.
- Mehlmann, L.M., Jones, T.L., Jaffe, L.A., 2002. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science* 297, 1343-1345.
- Memili, E., Peddinti, D., Shack, L.A., Nanduri, B., McCarthy, F., Sagirkaya, H., Burgess, S.C., 2007. Bovine germinal vesicle oocyte and cumulus cell proteomics. *Reproduction* 133, 1107-1120.
- Mermillod, P., Tomanek, M., Marchal, R., Meijer, L., 2000. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Mol Reprod Dev* 55, 89-95.
- Mi, H., Huang, X., Muruganujan, A., Tang, H., Mills, C., Kang, D., Thomas, P.D., 2017. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res* 45, D183-D189.
- Miller, D.J., Macek, M.B., Shur, B.D., 1992. Complementarity between Sperm Surface Beta-1,4-Galactosyl-Transferase and Egg-Coat Zp3 Mediates Sperm Egg Binding. *Nature* 357, 589-593.
- Morin, N., Sullivan, R., 1994. Expression of Fibronectin and a Fibronectin-Binding Molecule during Preimplantation Development in the Mouse. *Human reproduction* 9, 894-901.
- Munne, S., Dailey, T., Sultan, K.M., Grifo, J., Cohen, J., 1995. The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* 10, 1014-1020.
- Nagy, Z.P., Jones-Colon, S., Roos, P., Botros, L., Greco, E., Dasig, J., Behr, B., 2009. Metabolomic assessment of oocyte viability. *Reprod Biomed Online* 18, 219-225.

- Nagyova, E., Vanderhyden, B.C., Prochazka, R., 2000. Secretion of paracrine factors enabling expansion of cumulus cells is developmentally regulated in pig oocytes. *Biol Reprod* 63, 1149-1156.
- Neuer, A., Mele, C., Liu, H.C., Rosenwaks, Z., Witkin, S.S., 1998. Monoclonal antibodies to mammalian heat shock proteins impair mouse embryo development in vitro. *Human reproduction* 13, 987-990.
- Nonaka, M.I., Hishikawa, Y., Moriyama, N., Koji, T., Ogata, R.T., Kudo, A., Kawakami, H., Nonaka, M., 2003. Complement C4b-binding protein as a novel murine epididymal secretory protein. *Biol Reprod* 69, 1931-1939.
- Norris, R.P., Ratzan, W.J., Freudzon, M., Mehlmann, L.M., Krall, J., Movsesian, M.A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V.O., Jaffe, L.A., 2009. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* 136, 1869-1878.
- O'Neill, L.A.J., Bowie, A.G., 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7, 353-364.
- Olson, J.H., Xiang, X.Y., Ziegert, T., Kittelson, A., Rawls, A., Bieber, A.L., Chandler, D.E., 2001. Allurin, a 21-kDa sperm chemoattractant from *Xenopus* egg jelly, is related to mammalian sperm-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11205-11210.
- Parfenov, V., Potchukalina, G., Dudina, L., Kostyuchek, D., Gruzova, M., 1989. Human antral follicles: oocyte nucleus and the karyosphere formation (electron microscopic and autoradiographic data). *Gamete Res* 22, 219-231.
- Park, J.Y., Su, Y.Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S.L., Conti, M., 2004. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303, 682-684.
- Patel, V.J., Thalassinou, K., Slade, S.E., Connolly, J.B., Crombie, A., Murrell, J.C., Scrivens, J.H., 2009. A Comparison of Labeling and Label-Free Mass Spectrometry-Based Proteomics Approaches. *Journal of proteome research* 8, 3752-3759.
- Peddinti, D., Memili, E., Burgess, S.C., 2010. Proteomics-Based Systems Biology Modeling of Bovine Germinal Vesicle Stage Oocyte and Cumulus Cell Interaction. *PloS one* 5, e11240.
- Perricone, R., de Carolis, C., Moretti, C., Santuari, E., de Sanctis, G., Fontana, L., 1990. Complement, complement activation and anaphylatoxins in human ovarian follicular fluid. *Clinical and experimental immunology* 82, 359-362.
- Ravanti, L., Kahari, V.M., 2000. Matrix metalloproteinases in wound repair (Review). *Int J Mol Med* 6, 391-407.
- Redding, G.P., Bronlund, J.E., Hart, A.L., 2007. Mathematical modelling of oxygen transport-limited follicle growth. *Reproduction* 133, 1095-1106.
- Reddy, T., Gibbs, G.M., Merriner, D.J., Kerr, J.B., O'Bryan, M.K., 2008. Cysteine-rich secretory proteins are not exclusively expressed in the male reproductive tract. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237, 3313-3323.
- Regassa, A., Rings, F., Hoelker, M., Cinar, U., Tholen, E., Looft, C., Schellander, K., Tesfaye, D., 2011. Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. *Bmc Genomics* 12.
- Revelli, A., Delle Piane, L., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., Rinaudo, P., 2009. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol* 7, 40.

- Riley-Vargas, R.C., Lanzendorf, S., Atkinson, J.P., 2005. Targeted and restricted complement activation on acrosome-reacted spermatozoa. *Journal of Clinical Investigation* 115, 1241-1249.
- Rispoli, L.A., Payton, R.R., Gondro, C., Saxton, A.M., Nagle, K.A., Jenkins, B.W., Schrick, F.N., Edwards, J.L., 2013. Heat stress effects on the cumulus cells surrounding the bovine oocyte during maturation: altered matrix metalloproteinase 9 and progesterone production. *Reproduction* 146, 193-207.
- Robert, C., Gagne, D., Bousquet, D., Barnes, F.L., Sirard, M.A., 2001. Differential display and suppressive subtractive hybridization used to identify granulosa cell messenger RNA associated with bovine oocyte developmental competence. *Biology of Reproduction* 64, 1812-1820.
- Roberts, K.P., Wamstad, J.A., Ensrud, K.M., Hamilton, D.W., 2003. Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein Crisp-1. *Biol Reprod* 69, 572-581.
- Rock, K.L., Latz, E., Ontiveros, F., Kono, H., 2010. The Sterile Inflammatory Response. *Annu Rev Immunol* 28, 321-342.
- Russell, D.L., Doyle, K.M.H., Ochsner, S.A., Sandy, J.D., Richards, J.S., 2003a. Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. *J Biol Chem* 278, 42330-42339.
- Russell, D.L., Ochsner, S.A., Hsieh, M., Mulders, S., Richards, J.S., 2003b. Hormone-regulated expression and localization of versican in the rodent ovary. *Endocrinology* 144, 1020-1031.
- Saha, D., Patgaonkar, M., Shroff, A., Ayyar, K., Bashir, T., Reddy, K.V., 2014. Hemoglobin expression in nonerythroid cells: novel or ubiquitous? *International journal of inflammation* 2014, 803237.
- Salhab, M., Dhorne-Pollet, S., Auclair, S., Guyader-Joly, C., Brisard, D., Dalbies-Tran, R., Dupont, J., Ponsart, C., Mermillod, P., Uzbekova, S., 2013. In vitro maturation of oocytes alters gene expression and signaling pathways in bovine cumulus cells. *Molecular Reproduction and Development* 80, 166-182.
- Salustri, A., Yanagishita, M., Hascall, V.C., 1990. Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells. *Dev Biol* 138, 26-32.
- Sanchez-Lazo, L., Brisard, D., Elis, S., Maillard, V., Uzbekov, R., Labas, V., Desmarchais, A., Papillier, P., Monget, P., Uzbekova, S., 2014. Fatty Acid Synthesis and Oxidation in Cumulus Cells Support Oocyte Maturation in Bovine. *Molecular endocrinology* 28, 1502-1521.
- Schnorr, B., 2011. *Embryologie der Haustiere*. Enke Verlag.
- Scott, T.J., Carnevale, E.M., Maclellan, L.J., Scoggin, C.F., Squires, E.L., 2001. Embryo development rates after transfer of oocytes matured in vivo, in vitro, or within oviducts of mares. *Theriogenology* 55, 705-715.
- Seli, E., Robert, C., Sirard, M.A., 2010. OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. *Molecular human reproduction* 16, 513-530.
- Sessions-Bresnahan, D.R., Schauer, K.L., Heuberger, A.L., Carnevale, E.M., 2016. Effect of Obesity on the Preovulatory Follicle and Lipid Fingerprint of Equine Oocytes. *Biology of Reproduction* 94.
- Shimada, M., Hernandez-Gonzalez, I., Gonzalez-Robanya, I., Richards, J.S., 2006. During ovulation pattern recognition receptors (PRRs) characteristic of immune cells are induced in cumulus oocyte complexes (COCs) to confer immune cell-like functions. *Biology of Reproduction*, 155-155.

- Shomura, Y., Dragovic, Z., Chang, H.C., Tzvetkov, N., Young, J.C., Brodsky, J.L., Guerriero, V., Hartl, F.U., Bracher, A., 2005. Regulation of Hsp70 function by HspBP1: Structural analysis reveals an alternate mechanism for Hsp70 nucleotide exchange. *Molecular cell* 17, 367-379.
- Singh, R., Sinclair, K.D., 2007. Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. *Theriogenology* 68 Suppl 1, S56-62.
- Sirard, M.A., Coenen, K., 2006. In vitro maturation and embryo production in cattle. *Methods in molecular biology* 348, 35-42.
- Spaniel-Borowski, K., 2011. Ovulation as danger signaling event of innate immunity. *Molecular and cellular endocrinology* 333, 1-7.
- Speicher, D.W., Lee, K.B., Tang, H.Y., Echan, L., Ali-Khan, N., Zuo, X., Hembach, P., 2004. Current challenges in proteomics: Mining low abundance proteins and expanding protein profiling capacities. *Adv Mass Spectrom* 16, 37-57.
- Squires, E.L., Douglas, R.H., Steffenhagen, W.P., Ginther, O.J., 1974. Ovarian changes during the estrous cycle and pregnancy in mares. *J Anim Sci* 38, 330-338.
- Su, Y.Q., Wu, X., O'Brien, M.J., Pendola, F.L., Denegre, J.N., Matzuk, M.M., Eppig, J.J., 2004. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. *Dev Biol* 276, 64-73.
- Sugiura, K., Pendola, F.L., Eppig, J.J., 2005. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Developmental biology* 279, 20-30.
- Sun, Q.Y., Nagai, T., 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Dev* 49, 347-359.
- Sutton-McDowall, M.L., Gilchrist, R.B., Thompson, J.G., 2010. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction* 139, 685-695.
- Taylor, C.T., Johnson, P.M., 1996. Complement-binding proteins are strongly expressed by human preimplantation blastocysts and cumulus cells as well as gametes. *Mol Hum Reprod* 2, 52-59.
- Taylor, P., Botto, M., Walport, M., 1998. The complement system. *Current Biology* 8, R259-R261.
- Thelie, A., Papillier, P., Perreau, C., Uzbekova, S., Hennequet-Antier, C., Dalbies-Tran, R., 2009. Regulation of Bovine Oocyte-Specific Transcripts During In Vitro Oocyte Maturation and After Maternal-Embryonic Transition Analyzed Using a Transcriptomic Approach. *Molecular Reproduction and Development* 76, 773-782.
- Thomas, R.E., Armstrong, D.T., Gilchrist, R.B., 2004. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. *Biol Reprod* 70, 548-556.
- Thompson, J.G., Brown, H.M., Kind, K.L., Russell, D.L., 2015. The Ovarian Antral Follicle: Living on the Edge of Hypoxia or Not? *Biol Reprod* 92, 153.
- Tsafri, A., Chun, S.Y., Zhang, R., Hsueh, A.J., Conti, M., 1996. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Dev Biol* 178, 393-402.
- Tsuiki, A., Preyer, J., Hung, T.T., 1988. Fibronectin and Glycosaminoglycans in Human Preovulatory Follicular-Fluid and Their Correlation to Follicular Maturation. *Human reproduction* 3, 425-429.
- Turvey, S.E., Broide, D.H., 2010. Innate immunity. *J Allergy Clin Immun* 125, S24-S32.

- Vaccari, S., Weeks, J.L., 2nd, Hsieh, M., Menniti, F.S., Conti, M., 2009. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod* 81, 595-604.
- van den Hurk, R., Zhao, J., 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63, 1717-1751.
- Varani, S., Elvin, J.A., Yan, C., DeMayo, J., DeMayo, F.J., Horton, H.F., Byrne, M.C., Matzuk, M.M., 2002. Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Mol Endocrinol* 16, 1154-1167.
- Vassalli, J.D., Sappino, A.P., Belin, D., 1991a. The Plasminogen-Activator Plasmin System. *Journal of Clinical Investigation* 88, 1067-1072.
- Vassalli, J.D., Wohlwend, A., Huarte, J., Belin, D., Sappino, A.P., 1991b. The Plasminogen-Activator System in Development. *Thrombosis and haemostasis* 65, 868-868.
- Vassena, R., Mapletoft, R.J., Allodi, S., Singh, J., Adams, G.P., 2003. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* 60, 923-932.
- Wade, C.M., Giulotto, E., Sigurdsson, S., Zoli, M., Gnerre, S., Inslund, F., Lear, T.L., Adelson, D.L., Bailey, E., Bellone, R.R., Blocker, H., Distl, O., Edgar, R.C., Garber, M., Leeb, T., Mauceli, E., MacLeod, J.N., Penedo, M.C., Raison, J.M., Sharpe, T., Vogel, J., Andersson, L., Antczak, D.F., Biagi, T., Binns, M.M., Chowdhary, B.P., Coleman, S.J., Della Valle, G., Fryc, S., Guerin, G., Hasegawa, T., Hill, E.W., Jurka, J., Kiialainen, A., Lindgren, G., Liu, J., Magnani, E., Mickelson, J.R., Murray, J., Nergadze, S.G., Onofrio, R., Pedroni, S., Piras, M.F., Raudsepp, T., Rocchi, M., Roed, K.H., Ryder, O.A., Searle, S., Skow, L., Swinburne, J.E., Syvanen, A.C., Tozaki, T., Valberg, S.J., Vaudin, M., White, J.R., Zody, M.C., Broad Institute Genome Sequencing, P., Broad Institute Whole Genome Assembly, T., Lander, E.S., Lindblad-Toh, K., 2009. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* 326, 865-867.
- Wang, J.C., Foroud, T., Hinrichs, A.L., Le, N.X.H., Porjesz, B., Heath, A.C., Edenberg, H.J., Bierut, L.J., Goate, A.M., Collaborators, C., Collaborators, S., Collaborators, O., 2012. A Genome Wide Association Study of Alcohol Dependence Symptom Count in Extended Pedigrees from the Coga Study. *Alcohol Clin Exp Res* 36, 319a-319a.
- Wassarman, P.M., 1999. Mammalian fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96, 175-183.
- Wells, D., Alfarawati, S., Fragouli, E., 2008. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod* 14, 703-710.
- Wisniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M., 2009. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods* 6, 359-U360.
- Wrenzycki, C., Stinshoff, H., 2013. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. *Reprod Domest Anim* 48 Suppl 1, 38-43.
- Wright, P.C., Noirel, J., Ow, S.Y., Fazeli, A., 2012. A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. *Theriogenology* 77, 738-765 e752.
- Wysocki, V.H., Resing, K.A., Zhang, Q.F., Cheng, G.L., 2005. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods* 35, 211-222.
- Yamada, M., Gentry, P.A., 1995. The Hemostatic Profile of Equine Ovarian Follicular-Fluid. *Thrombosis research* 77, 45-54.
- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F.J., Elvin, J.A., Carino, C., Prasad, S.V., Skinner, S.S., Dunbar, B.S., Dube, J.L., Celeste, A.J., Matzuk, M.M., 2001. Synergistic roles of

- bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 15, 854-866.
- Yoo, S.W., Bolbot, T., Koulova, A., Sneeringer, R., Humm, K., Dagon, Y., Usheva, A., 2013. Complement factors are secreted in human follicular fluid by granulosa cells and are possible oocyte maturation factors. *J Obstet Gynaecol Res* 39, 522-527.
- Zhang, M., Su, Y.Q., Sugiura, K., Xia, G., Eppig, J.J., 2010. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science* 330, 366-369.
- Zhang, X., Jafari, N., Barnes, R.B., Confino, E., Milad, M., Kazer, R.R., 2005. Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. *Fertility and sterility* 83 Suppl 1, 1169-1179.
- Zhen, Y.J., Xu, N.F., Richardson, B., Becklin, R., Savage, J.R., Blake, K., Peltier, J.M., 2004. Development of an LC-MALDI method for the analysis of protein complexes. *J Am Soc Mass Spectr* 15, 803-822.
- Zimmermann, H., Braun, N., Kegel, B., Heine, P., 1998. New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. *Neurochemistry international* 32, 421-425.

9. ANHANG

9.1. Produktverzeichnis

- 9.1.1. Aspirationspipette „micro classic“ (Handling-Pipette): Brand GmbH+Co, 97877 Wertheim, Deutschland
- 9.1.2. Mikropipetten BLAUBRAND®, BRAND GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland
- 9.1.3. Bildbearbeitungsprogramm: Cronus
- 9.1.4. Eppendorf-Tube: Sarstedt, 1.5 ml Röhrchen, 51588 Nümbrecht, Deutschland
- 9.1.5. Inkubator: Sanyo CO₂ Inkubator (38.5°C, 5% CO₂), Labtec Services, 5612 Villmergen, Schweiz
- 9.1.6. Mikroskop: Olympus IX71, Gynemed Medizinprodukte GmbH, 23738 Lensahn, Deutschland
- 9.1.7. Heizplatten und Heizbehälter von Minitube, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland
- 9.1.8. Plastikpipetten: Plastic-Tip Ejector, Gilson (Schweiz) AG, 8932 Mettmenstetten, Schweiz (0.2-2µl, 20µ, 1-10µl, 20-200µl, 1000µl)
- 9.1.9. Spritzen 10ml und 20ml, BD Discardit™ II mit Luer Ansatz, Becton Dickinson AG, Allschwil, Schweiz
- 9.1.10. 10er Einwegskalpelle mit Griff, Swann-Morton, Sheffield, England
- 9.1.11. Falconröhrchen 15ml und 30ml, CELLSTAR®TUBES, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
- 9.1.12. Petri-Schalen
- 9.1.13. Uhrgläser von Duran Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland, bezogen bei Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- 9.1.14. Kulturschalen, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
- 9.1.15. Stripper-Pipette: Origio, Midatlantic Devices, MXL3-STR, 2760 Måløv, Dänemark
- 9.1.16. Zählkammer nach Neubauer : Faust Laborbedarf AG, 8201 Schaffhausen, Schweiz
- 9.1.17. Sonoreaktor, UTR 200, Hielscher Ultrasonics GmbH, Deutschland
- 9.1.18. Qubit® Protein Assay Kit, Life Technologies, Carlsbad, California, USA
- 9.1.19. Zentrifugenfilter Ultracel-30 Membran, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
- 9.1.20. Massenspektrometer, Thermo Scientific, USA
- 9.1.21. Nano HPLC System, EASY-nLC 1000, Thermo Scientific, Deutschland

9.2. Medienverzeichnis

- 9.2.1. DMEM Hepes, hergestellt im Labor am Tierspital Zürich durch Frau B. Pineroli

15.57g DMEM/F-12, HEPES, Powder, Life Technologies 42400-010
0,05g Gentamycinsulphate 50µg/ml, Sigma G3632
1.125g NaHCO₃ 1,125g/L, Sigma S5761
1000ml H₂O, Ampuwa Fresenius
1g BSA (FAF), Sigma A7030/pH=7.2, Osmolarität=277

- 9.2.2. DMEM Advanced, hergestellt im Labor am Tierspital Zürich durch Frau B. Pineroli

100ml Advanced DMEM/F12, Life Technologies 12634-010
0,005g Gentamycinsulphate (50µg/ml), Sigma G 3632
1.25ml Glutamax (200mM) 365 mg/L, Life Technologies 35050-038
0,22g NaHCO₃ 2,2g/Liter, Sigma S5761
0,1g BSA 1mg/ml, Sigma A7030
5µl EGF 50ng/ml, Sigma E4127

- 9.2.3. NaCl 0.9% Fresenius, Fresenius Kabi AG, Oberdorf NW, Schweiz
9.2.4. Heparin „Bichsel“ 5000 IE/ml, Dr. G. Bichsel AG, Unterseen Schweiz
9.2.5. DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Deutschland
9.2.6. Penicillin: 1g Bencylpenicillinum natricum, Streuli Pharma AG, 8730 Uznach, Schweiz
9.2.7. Trypsin: Trypsin-EDTA-Lösung, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Deutschland
9.2.8. Hormone: 1 aliquot (25µl) hormone (P.G. 600 Veterinaria)
-400 I.U. PMSG +200 I.U. hCG Trockensubstanz
-lösen in 1ml 0,9% NaCl
9.2.9. Hoechst-33258 Färbung: 10µl Hoechst (12,5µg/µl) + 10µl PBS+30µl Glycerol
9.2.10. Paraformaldehyde, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 04-479Q, München, Deutschland
9.2.11. Paraformaldehyd 3%: 0,3g Paraformaldehyd in 10ml PBS im Wasserbad auf 60°C erwärmt. Bis zum Klären der Lösung wurde tropfenweise 10 n Natronlauge der Lösung zugesetzt und anschließend ein pH-Wert von 7,4 durch Hinzufügen von 1n Salzsäure eingestellt. Die Lösung wurde bei -20°C gelagert und zum Gebrauch im Wasserbad bei 37°C aufgetaut.
9.2.12. Trypanblau Lösung, Sigma T6146, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Deutschland
9.2.13. SDS Lysepuffer (4% SDS, 100 mM Tris/HCL pH 8,2, 0,1 M DTT-dithiothreitol)
9.2.14. UT Puffer (Urea 8M in 100mM Tris/HCL pH8,2)

9.3. Protokoll zur Oozytengewinnung

In-vivo Gruppe

Vorbereitung:

- Waschtropfen mit 100µl PBS (100 ml Flasche; Sigma Aldrich D8537+Glukose+Pyruvat) in 60mm Petrischalen (2x4 Tropfen) mit Mineralöl übergiessen.
- Stripper Pipette (3µl und 1µl)
- Handling Pipette
- Trypsin 1:5 verdünnt: 1 Teil Trypsin (20µl), 4 Teile PBS D8538+Glukose+Pyruvat (80µl)
- Trypanblau verdünnen: 75µl Trypanblau mit 25µl PBS mischen
- 1,5 ml Proberöhrchen mit 7µl Trypsin 1:5 und mit Follikel ID beschriften
- 1,5 ml Proberöhrchen mit 4µl Trypanblau für die Neubauerzählkammer

Verarbeitung:

1. Der KOK wurde in 4 Tropfen von 100µl PBS (mit Mineralöl übergossen) gewaschen.
2. Der KOK wurde unter dem Mikroskop in seinem längsten Durchmesser vermessen und die Bilder wurden mit der Follikel ID datiert.
3. Die Kumuluszellen wurden mit einer 3µl Stripperpipette von der Oozyte getrennt.
4. 3 µl Kumulus wurde mit der Stripperpipette aspiriert und in ein Proberöhrchen mit 7µl Trypsin (1:5) gegeben.
5. Das Proberöhrchen wurde 10 min. bei 37°C gehalten und 5 x hoch und runter pipettiert in einer Wiederholung von 2 x.
6. Nach 10 min. pipettierte man 1µl Kumulus Suspension in ein Proberöhrchen mit 4 µl Trypan Blue (Zähllösung).
7. Die restliche 9 µl Kumulus Suspension wurden dann in flüssigem Stickstoff eingefroren.
8. Die Zähllösung wurde 10-mal hoch und runter pipettiert mit einer 10µl Pipette. Die Neubauerzählkammer wurde auf einer Seite mit der gesamten Suspension gefüllt. Gezählt wurden grosse weisse, kleine weisse und grosse blaue Kumuluszellen.
9. Höchst Färbung der Oozyte:
 - Alle überschüssige Kumuluszellen die an der Oozyte kleben in Trypsin auflösen
 - Die Oozyte 4x in PBS waschen
 - Die Oozyte für 15 min. in Formalin legen
 - Die Oozyte mit einer Stripperpipette auf einen Objektträger geben (mit Kreis markieren)
 - Überschüssige Flüssigkeit aspirieren
 - 6µl Höchst Lösung in einer Diagonalen aus Tropfen über die Oozyte geben
 - Deckglas vorsichtig mit einer Pinzette darauf geben, sodass keine Luft eingeschlossen wird
 - Alle vier Ränder vom Deckglas mit Klebstoff versiegeln

In-vitro Gruppe

Vorbereitung:

Tag 1

- Waschtropfen mit 100µl DMEM Advanced in 60 mm Petrischalen (2x4 Tropfen) mit Mineralöl übergiessen
- Maturationstropfen: 975µl DMEM Advanced + Hormone (siehe Protokoll für diese Medien). Man brauchte 50µl Tropfen für 10 Oozyten oder 30µl Tropfen für 5 Oozyten in einer 35 mm Petrischale, mit Mineralöl übergossen
- Die Wasch- und Maturationstropfen wurden 1 h vor dem Gebrauch bei 38.5 °C und 5% CO₂, präinkubiert
- DMEM Hepes wurde im Wärmeschrank auf 37°C aufgewärmt
- Die Oozyten wurden 30 h *in-vitro* maturiert, in DMEM und Hormonen
-

Tag 2

- 1.5 h in DMEM Hepes bei Raumluft auf Wärmeplatte
- Waschtropfen mit 100µl PBS (100 ml Flasche; Sigma Aldrich D8537+Glukose+Pyruvat) in 60mm Petrischalen (2x4 Tropfen) mit Mineralöl übergiessen
- Stripper Pipette (3µl und 1µl)
- Handling Pipette
- Trypsin 1:5 verdünnt: 1 Teil Trypsin (20µl), 4 Teile PBS D8538+Glukose+Pyruvat (80µl)
- Trypanblau verdünnen: 75µl Trypanblau mit 25µl PBS mischen
- 1.5 ml Proberöhrchen mit 7µl Trypsin 1:5 füllen, und mit Follikel ID beschriften
- 1.5 ml Proberöhrchen mit 4µl Trypanblau füllen, für die Neubauerzählkammer

Verarbeitung:

10. Der KOK wurde in 4 Tropfen von 100µl PBS (mit Mineralöl übergossen) gewaschen
11. Der KOK wurde unter dem Mikroskop in seinem längsten Durchmesser vermessen, und die Bilder wurden mit der Follikel ID datiert.
12. Die Kumuluszellen wurden mit einer 3µl Stripperpipette von der Oozyte getrennt.
13. 3 µl Kumulus wurde mit der Stripperpipette aspiriert und in ein Proberöhrchen mit 7µl Trypsin (1:5) gegeben.
14. Das Proberöhrchen wurde 10 min. bei 37°C gehalten, und 5 x hoch und runter pipettiert, in einer Wiederholung von 2 x.
15. Nach 10 min. pipettierte man 1µl Kumulus Suspension in ein Proberöhrchen mit 4 µl Trypan Blue (Zähllösung)
16. Die restliche 9 µl Kumulus Suspension wurden dann in flüssigem Stickstoff eingefroren.
17. Die Zähllösung wurde 10x hoch und runter pipettiert mit einer 10µl Pipette. Die Neubauerzählkammer wurde auf einer Seite mit der gesamten Suspension gefüllt. Gezählt wurden grosse weisse, kleine weisse und grosse blaue Kumuluszellen
18. Höchst Färbung der Oozyte:

- Alle überschüssigen Kumuluszellen die an der Oozyte kleben in Trypsin auflösen
- Die Oozyte 4x in PBS waschen
- Die Oozyte für 15 min. in Formalin legen
- Die Oozyte mit einer Stripperpipette auf einen Objektträger geben (mit Kreis markieren)
- Überschüssige Flüssigkeit aspirieren
- 6µl Höchst Lösung in einer Diagonalen aus Tropfen über die Oozyte geben
- Deckglas vorsichtig mit einer Pinzette darauf geben, sodass keine Luft eingeschlossen wird
- Alle vier Ränder vom Deckglas mit Klebstoff versiegeln

9.4. Tabelle mit allen signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen

In dieser Tabelle sind alle 248 signifikant unterschiedlichen Proteine aus der Uniprot Datenbank für Pferde gelistet. Für Proteine, die auf das gleiche homologe Protein verweisen, ist die Accession grau hinterlegt. In Klammer wird die entsprechende homologe Proteingruppe mit der Anzahl der zugehörigen equinen Uniprot Accessions genannt. Für die Überrepräsentationsanalyse mit Hilfe der STRING-Datenbank wurde jeweils die equine Uniprot Accession mit dem höchsten Confidence-Score verwendet, diese sind mit einem Stern markiert. Die Tabelle zeigt neben den Daten zur Identifikation der Proteine die normalisierten Mittelwerte aus der Progenesis QI Analyse sowie deren Transformation mit dem Arkussinus Hyperbolicus (Arcsinh_{yp}), der auch für die Abbildungen im Ergebnisteil verwendet wurde.

Accession (Protein Group; n Members)	Description	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	In-Vivo		In-Vitro		Max fold change	Highest mean condition	In-Vivo (ArcSinhYp)		In-Vitro (ArcSinhYp)		Anova (p)
					Mean	SD	Mean	SD			Mean	SD	Mean	SD	
F7ABW7_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P08709 FAT7_HUMAN Coagulation factor VII OS=Homo sapiens GN=F7... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=F7 PE=3 SV=1	2	2	1.99	6004.61	5994.49	0.00	0.00	Infinity	InVivo	6.82	4.69	0.00	0.00	0.00
F6P170_HORSE	homolog (eV: 1.0e-47) sp P01709 LV206_HUMAN Ig lambda chain V- II region IIGC OS=Homo sa... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=4 SV=1	2	2	1.99	46475.72	76379.55	0.00	0.00	Infinity	InVivo	7.77	5.51	0.00	0.00	0.00
F6T1N6_HORSE	homolog (eV: 9.0e-95) sp Q69D0 C1QA_PIG Complement C1q subcomponent subunit A OS=Sus ... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=C1QA PE=4 SV=1	2	2	1.99	136756.34	156864.89	41.31	41.31	3310.75	InVivo	9.93	4.80	2.45	2.61	0.00
F7DN50_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp O75417 DPOLQ_HUMAN DNA polymerase theta OS=Homo sapiens GN=PD... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=PD... PE=4 SV=1	2	1	1.97	44647.77	87900.69	17.92	17.92	2491.06	InVivo	8.33	4.30	1.16	1.97	0.00
F6PNY0_HORSE	homolog (eV: 4.0e-43) sp P01715 LV401_HUMAN Ig lambda chain V- II region IIGC OS=Homo sa... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=4 SV=1	5	5	4.99	5276960.87	7227395.53	3217.89	3217.89	1639.88	InVivo	13.76	3.30	6.52	3.83	0.00
zz ZZ_FGCZCont 0049	sp C05_HUMAN	3	1	2.92	31770.43	36420.93	33.00	33.00	962.67	InVivo	9.06	4.19	0.88	2.32	0.00
F7B778_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q6588 SMCE_HUMAN Structural maintenance of chromosomes prote... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=SMCE PE=4 SV=1	2	2	1.87	7044257.95	16936553.54	7716.45	7716.45	912.89	InVivo	12.48	3.67	8.86	2.07	0.04
FIBA_HORSE	Fibrinogen alpha chain (Fragment) OS=Equis caballus GN=FGA PE=1 SV=1	2	2	1.99	654460.41	1614173.34	866.14	866.14	755.61	InVivo	10.20	3.43	6.26	1.75	0.02
F6YCW8_HORSE; F6VE73_HORSE; G5CW75_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P04114 APOB_HUMAN Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens GN=APO... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=APOB PE=4 SV=1 [F6YCW8_HORSE,F6VE73_HORSE]	2	2	1.99	3542.20	6395.56	6.78	6.78	522.47	InVivo	5.50	4.27	1.11	1.86	0.03
F6ZD61_HORSE; F7BSN5_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q08569 ZP3R_CAVPO Zona pellucida sperm-binding protein 3 rece... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=4 SV=1 [F6ZD61_HORSE,F7BSN5_HORSE]	3	1	2.98	110353.93	198288.66	218.34	218.34	505.42	InVivo	10.32	2.27	2.01	3.47	0.00
H9GZQ9_HORSE (IGHG1; 4)	homolog (eV: 0.0) sp P01857 IGHG1_HUMAN Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=IGHG1 PE=4 SV=1	48	4	47.63	3213195.87	6446757.96	11943.26	11943.26	269.04	InVivo	13.17	3.18	9.52	1.28	0.02
F6YS25_HORSE; zz ZZ_FGCZCont0 023	homolog (eV: 0.0) sp P00918 CAH2_HUMAN Carbonic anhydrase 2 OS=Homo sapiens GN=CA2... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=CA2 PE=4 SV=1	4	4	3.97	230904.84	556922.54	1571.41	1571.41	146.94	InVivo	10.56	2.35	5.89	3.89	0.02
F7CFN5_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P07357 CDBA_HUMAN Complement component C8 alpha chain OS=Homo... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=C8A PE=4 SV=1	2	2	1.99	111943.86	167440.24	980.47	980.47	114.17	InVivo	10.28	2.74	6.41	2.17	0.01
F6ZA94_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q99816 TS101_HUMAN Tumor susceptibility gene 101 protein OS=H... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=TS101 PE=4 SV=1	2	2	1.91	1687876.31	2354238.46	16777.75	16777.75	100.60	InVivo	13.37	2.67	10.10	1.00	0.01
F6UHF2_HORSE (CFAH; 2)	homolog (eV: 0.0) sp P08603 CFAH_HUMAN Complement factor H OS=Homo sapiens GN=CFH... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=LOC100146849 PE=4 SV=1	7	1	6.94	22426.25	25481.50	227.00	227.00	98.80	InVivo	8.60	4.13	3.77	3.54	0.04
F7CAC5_HORSE	homolog (eV: 3.0e-43) sp B9A064 IGL1S_HUMAN Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 O... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=LOC100062472 PE=4 SV=1	15	9	14.92	193547751.28	248732370.43	2046755.39	2046755.39	94.56	InVivo	18.76	1.72	14.94	0.92	0.00
F6QAU5_HORSE	homolog (eV: 7.0e-42) sp P0CF74 LACB_HUMAN Ig lambda d=6 chain C region OS=Homo sapiens ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=4 SV=1	9	3	8.84	37500571.96	37328775.69	472881.08	472881.08	79.30	InVivo	17.06	2.10	13.40	1.07	0.00
F6PH38_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P02675 FIBB_HUMAN Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FB... Fibrinogen beta chain (Fragment) OS=Equis caballus GN=FB PE=4 SV=1	77	77	76.45	392469230.81	357239594.97	6076789.91	6076789.91	64.58	InVivo	19.55	2.01	16.23	0.43	0.00
F7BM31_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P05546 HEP2_HUMAN Heparin cofactor 2 OS=Homo sapiens GN=SERPL... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=SERPIND1 PE=3 SV=1	8	8	7.92	2974389.64	3228518.52	46082.48	46082.48	64.54	InVivo	14.63	2.01	10.80	1.10	0.00
Q28383_HORSE	homolog (eV: 1.0e-97) sp Q9XSE9 HBA_EQUIN Hemoglobin subunit alpha OS=Equis przewalski... Horse BII alpha- 2 globin OS=Equis caballus PE=3 SV=1	23	2	22.91	75468616.27	159905943.65	1221128.19	1221128.19	61.80	InVivo	16.99	2.06	14.38	0.84	0.01
F6SP11_HORSE	sp ADM8Q6 LACT_HUMAN Ig lambda d=7 chain C region OS=Homo sapiens ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=4 SV=1	33	33	32.75	175071655.62	342654379.40	3010531.75	3010531.75	58.15	InVivo	18.37	1.67	15.54	0.43	0.00
F6RUZ6_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P02671 FIBA_HUMAN Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FA... Fibrinogen alpha chain OS=Equis caballus GN=FA PE=4 SV=1	29	13	28.83	84725131.56	87823886.48	1462370.73	1462370.73	57.94	InVivo	17.94	2.03	14.78	0.51	0.00
F6QX36_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q0VCM5 ITIH1_BOVIN Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=ITIH1 PE=4 SV=1	76	73	75.28	329545113.82	212541922.66	5915968.38	5915968.38	55.70	InVivo	19.76	1.55	16.24	0.31	0.00
H9GZU9_HORSE (IGHG1; 4)*	homolog (eV: 0.0) sp P01857 IGHG1_HUMAN Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=4 SV=1	97	58	95.81	708991387.33	1070868119.68	13216272.43	13216272.43	53.65	InVivo	19.97	1.76	17.03	0.36	0.00

Accession (Protein Group; n Members)	Description	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	In-Vivo		In-Vitro		Max fold change	Highest mean condition	In-Vivo (ArcSinhYp)		In-Vitro (ArcSinhYp)		Anova (p)
					Mean	SD	Mean	SD			Mean	SD	Mean	SD	
F7DXM5_HORSE (A1AT2; 2)	homolog (eV: 0.0) sp P38029 A1AT2_HORSE Alpha-1-antitrypsin 2 OS=Equis caballus... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=LOC10065068 PE=3 SV=1	25	4	24.82	12355412.14	15466752.34	230470.63	230470.63	53.61	InVivo	16.01	1.86	12.61	1.22	0.00
H9GZR2_HORSE (IGHG4; 2)*	homolog (eV: 0.0) sp P01861 IGHG4_HUMAN Ig gamma-4 chain C region OS=Homo sapiens ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=4 SV=1	48	7	47.52	5510913.73	12189385.49	104223.79	104223.79	52.88	InVivo	14.35	2.05	12.20	0.36	0.02
H9GZT5_HORSE (IGHG1; 4)	homolog (eV: 0.0) sp P01857 IGHG1_HUMAN Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=4 SV=1	45	34	44.44	627329688.34	750955319.05	11962255.90	11962255.90	52.44	InVivo	19.99	1.81	16.96	0.25	0.00
F6XWM5_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q5R5F6 HPT_PONAB Haptoglobin OS=Pongo abelii GN=HPT PE=2 SV=1 Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=HPT PE=3 SV=1	37	37	36.76	133044080.15	217914774.48	2583068.27	2583068.27	51.51	InVivo	18.21	1.85	15.40	0.36	0.00
F7BAY6_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P35747 ALBU_HORSE Serum albumin OS=Equis caballus GN=ALB PE=1... Serum albumin OS=Equis caballus GN=ALB PE=4 SV=1	248	8	245.75	125257523.18	143658412.00	2445815.17	2445815.17	51.21	InVivo	18.57	1.57	15.17	0.73	0.00
F6RDD3_HORSE; Q8TU6_HORSE; sp P02062 HBB _HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P02062 HBB_HORSE Hemoglobin subunit beta OS=Equis caballus GN... Hemoglobin subunit beta OS=Equis caballus GN=HBB PE=3 SV=1 [F6RDD3_HORSE,sp P02062 HBB_HORSE]	50	50	49.73	710758778.14	1542374971.92	14658363.90	14658363.90	48.49	InVivo	19.36	1.94	16.99	0.67	0.01
H9GZS6_HORSE (IGHG4; 2)	homolog (eV: 0.0) sp P01861 IGHG4_HUMAN Ig gamma-4 chain C region OS=Homo sapiens ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=4 SV=1	44	3	43.59	2599106.74	4815554.25	54986.67	54986.67	47.27	InVivo	13.48	2.46	11.38	0.75	0.05
F6V5H1_HORSE	homolog (eV: 6.0e-37) sp P01834 IGKC_HUMAN Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=LOC100630729 PE=4 SV=1	10	10	9.96	81461490.49	123968840.61	1853240.80	1853240.80	43.96	InVivo	17.53	1.97	15.08	0.33	0.01
F6W2Y1_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P02679 FIBG_HUMAN Fibrinogen gamma chain OS=Homo sapiens GN=... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=FGB PE=4 SV=1	69	67	67.45	229450826.24	241588448.43	5595119.47	5595119.47	41.01	InVivo	19.08	1.78	16.18	0.33	0.00
F7BXD8_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q43866 CD5L_HUMAN CD5 antigen-like OS=Homo sapiens GN=CD5L PE... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=CD5L PE=4 SV=1	2	2	1.99	86913.40	107115.56	2205.01	2205.01	39.42	InVivo	11.23	1.52	8.04	0.83	0.00
H9GZV9_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P01871 IGHM_HUMAN Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGH... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=IGHM PE=4 SV=1	27	26	26.75	29335775.52	33261642.37	798809.57	798809.57	36.72	InVivo	17.02	1.71	14.26	0.22	0.00
F6R4T7_HORSE (A2MG; 2)*	homolog (eV: 0.0) sp P01023 A2MG_HUMAN Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=A2M PE=4 SV=1	104	97	103.09	157945538.38	157815985.09	4459532.59	4459532.59	35.42	InVivo	18.78	1.68	15.99	0.18	0.00
F6RRV1_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q9UGM5 FETUB_HUMAN Fetuin-B OS=Homo sapiens GN=FETUB PE=1 SV=2 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=FETUB PE=4 SV=1	13	13	12.91	2496909.91	4098497.04	74512.49	74512.49	33.51	InVivo	14.12	2.00	11.71	0.71	0.01
F6VIR6_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P04217 A1BG_HUMAN Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1... Alpha-1B-glycoprotein OS=Equis caballus GN=A1BG PE=4 SV=1	23	23	22.91	114948022.83	144826967.81	3674189.45	3674189.45	31.29	InVivo	18.29	1.73	15.78	0.26	0.00
Q0R0C8_HORSE; Q38R8B_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P13753 HA1B_BOVIN BOLA class I histocompatibility antigen, al... MHC class I antigen 2470.b (Fragment) OS=Equis caballus GN=Eqa-16 PE=2 SV=1	14	2	13.82	75224.06	165791.27	2436.36	2436.36	30.88	InVivo	9.38	2.53	5.32	4.22	0.05
F6REX3_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q61838 A2M_MOUSE Alpha-2-macroglobulin OS=Mus musculus GN=A2M... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=LOC10061763 PE=4 SV=1	15	14	14.91	1341845.87	1804129.04	43604.85	43604.85	30.77	InVivo	13.58	1.93	11.25	0.61	0.01
F7CZW9_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P05155 IC1_HUMAN Plasma protease C1 inhibitor OS=Homo sapiens... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=SERPING1 PE=3 SV=1	5	5	4.97	1775877.69	1738626.31	59358.73	59358.73	29.92	InVivo	14.37	1.55	11.38	0.85	0.00
Q95M34_HORSE (IGHG1; 4)	homolog (eV: 0.0) sp P01857 IGHG1_HUMAN Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens ... Immunoglobulin gamma 1 heavy chain constant region (Fragment) OS=Equis caballus GN=IGHC1 PE=2 SV=1	48	4	47.62	3437415.06	4593625.01	121055.63	121055.63	28.40	InVivo	14.45	2.14	12.01	0.91	0.02
F654LO_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P26022 PTX3_HUMAN Pentraxin-related protein PTX3 OS=Homo sapiens... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=PTX3 PE=4 SV=1	5	4	4.94	391202.50	552796.46	16314.64	16314.64	23.98	InVivo	12.64	1.72	9.37	1.47	0.00
F7D576_HORSE	homolog (eV: 7.0e-34) sp P06316 LV1D7_HUMAN Ig lambda chain V- I region BL2 OS=Homo sapiens... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=LOC100147544 PE=4 SV=1	6	4	5.86	679827.78	861260.24	29771.07	29771.07	22.84	InVivo	12.92	2.13	10.48	1.23	0.02
F6V8B1_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P04004 VTNC_HUMAN Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=VTN PE=4 SV=1	7	7	6.96	4071259.58	4638390.26	178502.10	178502.10	22.81	InVivo	15.22	1.36	12.39	1.03	0.00
F6Z135_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P04196 HRG_HUMAN Histidine-rich glycoprotein OS=Homo sapiens ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=HRG PE=4 SV=1	27	27	26.85	25247666.56	41567969.73	1200992.24	1200992.24	21.02	InVivo	16.72	1.53	14.61	0.44	0.00
F6Q713_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q9TUG3 C7_PIG Complement component C7 OS=Sus scrofa GN=C7 PE... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=C7 PE=4 SV=1	7	7	6.95	739105.76	1327114.06	35436.07	35436.07	20.86	InVivo	13.12	1.62	11.09	0.45	0.01
F6UNB5_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q29550 EST1_PIG Liver carboxylesterase OS=Sus scrofa PE=1 SV=1 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=LOC100147112 PE=4 SV=1	10	2	9.89	2685546.15	3531007.66	128995.50	128995.50	20.82	InVivo	14.65	1.59	12.29	0.73	0.00

Accession (Protein Group; n Members)	Description	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	In-Vivo		In-Vitro		Max fold change	Highest mean condition	In-Vivo (ArcSinhYp)		In-Vitro (ArcSinhYp)		Anova (p)
					Mean	SD	Mean	SD			Mean	SD	Mean	SD	
F7CTJ3_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P19823 ITH2_HUMAN Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain ... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=ITH2 PE=4 SV=1 [F7CTJ3_HORSE,F7DAF6_HORSE,F7DL17_HORSE]	34	32	33.76	49246903.92	34071307.17	2411605.03	2411605.03	20.42	InVivo	17.96	1.29	15.36	0.27	0.00
F6T0P6_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q3MHN5 VTDB_BOVIN Vitamin D-binding protein OS=Bos taurus GN=... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=GC PE=4 SV=1	41	41	40.64	27867154.50	34444658.27	1372717.81	1372717.81	20.30	InVivo	16.96	1.63	14.79	0.30	0.00
F6PQ46_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P00450 CERU_HUMAN Ceruloplasmin OS=Homo sapiens GN=CP PE=1 SV=1 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=CP PE=4 SV=1	49	47	48.61	26726565.04	35874674.78	1373065.47	1373065.47	19.46	InVivo	16.83	1.59	14.77	0.33	0.01
H9GZU8_HORSE (IGHG2; 2)*	homolog (eV: 0.0) sp P01859 IGHG2_HUMAN Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=4 SV=1	43	25	42.69	58621267.73	85377430.97	3043188.48	3043188.48	19.26	InVivo	17.85	1.24	15.51	0.55	0.00
F6UZH0_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P02760 AMBP_HUMAN Protein AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=AMBP PE=4 SV=1	11	8	10.85	2457587.83	2434143.48	136317.54	136317.54	18.03	InVivo	14.77	1.44	12.14	0.88	0.00
F6ZL5_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P02648 APOA1_CANFA Apolipoprotein A-I OS=Canis familiaris GN=... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=APOA1 PE=4 SV=1	50	45	49.77	74012353.91	110557529.36	4192880.31	4192880.31	17.65	InVivo	18.01	1.43	15.90	0.29	0.00
F7BLE3_HORSE (CO3; 2)	homolog (eV: 0.0) sp Q2UUV4 CO3_BOVIN Complement C3 OS=Bos taurus GN=C3 PE=1 SV=2 Uncharacterized protein OS=Equis caballus PE=4 SV=1	85	18	84.40	18261467.48	21495012.05	1041584.48	1041584.48	17.53	InVivo	16.60	1.53	14.49	0.35	0.00
F7AU56_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q5R5A4 CFAL_PONAB Complement factor I OS=Pongo abelli GN=CFI ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=CFI PE=4 SV=1	5	5	4.98	822156.98	955086.16	47163.03	47163.03	17.43	InVivo	13.74	1.19	11.38	0.41	0.00
F7DLT3_HORSE-F 7BG94_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q16853 ADC3_HUMAN Membrane primary amine oxidase OS=Homo sapiens ... Amine oxidase OS=Equis caballus GN=ADC3 PE=3 SV=1	8	6	7.97	1509859.20	2531070.87	87331.82	87331.82	17.29	InVivo	13.72	1.81	11.82	0.74	0.02
F6SSX7_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp O15021 MAST4_HUMAN Microtubule- associated serine/threonine-protein Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=MAST4 PE=4 SV=1	2	1	1.92	415685.98	631480.92	24527.93	24527.93	16.95	InVivo	12.19	2.34	9.68	1.66	0.04
F6RMD0_HORSE-F REV_F6W6F5_H ORSE	homolog (eV: 0.0) sp P00751 CFAB_HUMAN Complement factor B OS=Homo sapiens GN=CFB ... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=CFB PE=3 SV=1	29	26	28.75	4428392.15	5654968.63	278195.06	278195.06	15.92	InVivo	15.13	1.53	13.12	0.54	0.01
F6QMJ6_HORSE	homolog (eV: 1.0e-81) sp P00258 ADX_PIG Adrenodoxin, mitochondrial OS=Sus scrofa GN=FD... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=FDX1 PE=4 SV=1 [F6QMJ6_HORSE,K9KA16_HORSE]	4	4	3.98	2466192.54	4331808.73	158789.97	158789.97	15.53	InVivo	14.15	1.78	12.59	0.42	0.04
H9GZS9_HORSE (IGHG2; 2)	homolog (eV: 0.0) sp P01859 IGHG2_HUMAN Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=4 SV=1	20	18	19.87	46019642.12	59004556.19	3040650.17	3040650.17	15.13	InVivo	17.51	1.48	15.58	0.33	0.01
F7AE68_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q06033 ITH3_HUMAN Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain ... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=ITH3 PE=4 SV=1 [F7AE68_HORSE,F7AV1D_HORSE]	23	23	22.78	5253274.39	4946909.53	350293.99	350293.99	15.00	InVivo	15.55	1.43	13.40	0.34	0.00
F7ASE1_HORSE-F 7AWQ9_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q0NPH3 IL1AP_HUMAN Interleukin-1 receptor accessory protein O... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=IL1RAP PE=4 SV=1	2	2	1.96	273798.67	401573.93	18326.51	18326.51	14.94	InVivo	12.03	1.76	9.71	1.42	0.02
F6XSF7_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P0CDL4 CO4A_HUMAN Complement C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A PE=1 ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=C4A PE=4 SV=1	58	56	57.44	33628886.72	37149124.14	2345272.45	2345272.45	14.34	InVivo	17.28	1.47	15.26	0.46	0.00
F6USP9_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q5R8X6 PLMN_PONAB Plasminogen OS=Pongo abelli GN=PLG PE=2 SV=1 Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=LOC100630147 PE=3 SV=1	25	24	24.67	6070480.75	7943438.07	438435.43	438435.43	13.85	InVivo	15.24	1.77	13.43	0.74	0.03
F6PP62_HORSE-F 6QBE4_HORSE-F 7AIT9_HORSE-F AJE4_HORSE	homolog (eV: 1.0e-26) sp P01706 LV203_HUMAN Ig lambda chain V- II region BOH OS=Homo sapiens ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=4 SV=1 [F6PP62_HORSE,F6QBE4_HORSE,F7AIT9_HORSE,F7AJE4_HORSE]	12	10	11.76	3464318.13	4282994.19	252821.58	252821.58	13.70	InVivo	14.88	1.56	13.05	0.41	0.01
sp P27425 TRFE _HORSE-Q9TQW 8_HORSE	Serotransferrin OS=Equis caballus GN=TF PE=2 SV=1	101	15	100.36	52469787.50	53418817.02	3846183.45	3846183.45	13.64	InVivo	17.93	1.25	15.82	0.29	0.00
F7AEK5_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P09487 PPB_BOVIN Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific is... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=ALPL PE=3 SV=1	2	2	1.99	191673.43	324179.11	14241.38	14241.38	13.46	InVivo	11.71	1.95	9.61	1.25	0.03
F7ABC9_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P23142 FBLN1_HUMAN Fibulin-1 OS=Homo sapiens GN=FBLN1 PE=1 SV=4 Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=FBLN1 PE=4 SV=1	9	8	8.87	3224031.72	1818783.44	242510.94	242510.94	13.29	InVivo	15.41	0.98	12.59	0.98	0.00
H9GZV1_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P01877 IGHA2_HUMAN Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=4 SV=1	13	13	12.82	9348826.00	10713945.84	720026.72	720026.72	12.98	InVivo	15.94	1.51	14.14	0.34	0.01
F6ZRE3_HORSE-F 7E3H8_HORSE (CFAH; 2)*	homolog (eV: 0.0) sp P08603 CFAH_HUMAN Complement factor H OS=Homo sapiens GN=CFH ... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=CFH PE=4 SV=1	31	25	30.73	4901015.14	6215915.01	387845.67	387845.67	12.64	InVivo	15.09	1.71	13.45	0.54	0.03
F7BTW7_HORSE (CO3; 2)*	homolog (eV: 0.0) sp Q2UUV4 CO3_BOVIN Complement C3 OS=Bos taurus GN=C3 PE=1 SV=2 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=LOC10060539 PE=4 SV=1	93	25	92.36	20525570.28	23885383.16	1653402.33	1653402.33	12.41	InVivo	16.82	1.38	14.68	0.90	0.00

Accession (Protein Group; n Members)	Description	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	In-Vivo		In-Vitro		Max fold change	Highest mean condition	In-Vivo (ArcSinHyp)		In-Vitro (ArcSinHyp)		Anova (p)
					Mean	SD	Mean	SD			Mean	SD	Mean	SD	
F6Z041_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P02749 APOH_HUMAN Beta-2-glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=AP... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=APDH PE=4 SV=1	20	19	19.84	8415101.43	8159487.87	682739.44	682739.44	12.33	InVivo	16.09	1.30	13.81	0.77	0.00
F6R3F4_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q14624 ITTH4_HUMAN Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=ITTH4 PE=4 SV=1	31	31	30.73	2506573.20	3343460.25	205266.17	205266.17	12.21	InVivo	14.42	1.67	12.88	0.30	0.03
F7C0D9_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P01042 KNG1_HUMAN Kininogen-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=1 SV=2 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=KNG1 PE=4 SV=1 [F7C0D9_HORSE,F7C0D9_HORSE]	18	17	17.87	6398970.00	9140781.63	536032.78	536032.78	11.94	InVivo	15.59	1.34	13.77	0.53	0.01
F6VB94_HORSE; F6UIMQ4_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp O11780 BGH3_PIG Transforming growth factor-beta-induced prote... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=TFB1 PE=4 SV=1	5	5	4.96	39965.03	44630.36	3487.75	3487.75	11.46	InVivo	10.64	1.35	7.03	3.52	0.03
F7DZE7_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q60994 ADIPO_MOUSE Adiponectin OS=Mus musculus GN=Adipoq PE=1... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=ADIPOQ PE=4 SV=1	4	4	3.94	319975.66	349194.06	29560.93	29560.93	10.82	InVivo	12.74	1.31	10.69	0.89	0.00
F6K1I8_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P02790 HEMO_HUMAN Hemopexin OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=HPX PE=4 SV=1	30	26	29.66	19711125.58	27963282.40	1896685.22	1896685.22	10.39	InVivo	16.65	1.38	15.13	0.19	0.01
F7CN11_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P02751 FINC_HUMAN Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1 SV=4 Fibronectin OS=Equis caballus GN=FN1 PE=4 SV=1	66	64	65.47	29314843.68	24589951.10	2854166.03	2854166.03	10.27	InVivo	17.35	1.33	15.54	0.21	0.00
F6R7S3_HORSE-F 6R6K3_HORSE (A2MG; 2)	homolog (eV: 0.0) sp P01023 A2MG_HUMAN Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=A2M PE=4 SV=1	30	27	29.79	3568339.72	4580791.56	359342.59	359342.59	9.93	InVivo	15.01	1.39	13.45	0.28	0.01
F7C4S0_HORSE; (FETUA; 2)*	homolog (eV: 0.0) sp P12763 FETUA_BOVIN Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Bos taurus GN=A... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=AHSG PE=4 SV=1	15	15	14.83	5590186.89	7486284.46	569783.03	569783.03	9.81	InVivo	15.36	1.48	13.89	0.34	0.03
zz ZZ_FGCTCont 0024	g 547753 sp P19013 K2CA_HUMAN KERATIN, TYPE II CYTOSKELETAL 4 (CYTOK KERATIN, TYPE II CYTOSKELETAL 4 (CYTOK	24	3	23.87	42396.80	57620.79	4971.63	4971.63	8.53	InVivo	10.46	1.70	8.28	1.39	0.02
F6X449_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P08697 A2AP_HUMAN Alpha-2-antiplasmin OS=Homo sapiens GN=SERP... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=SERPIN F2 PE=3 SV=1	7	7	6.96	1146960.59	1442473.18	144891.02	144891.02	7.92	InVivo	14.12	1.07	12.33	0.90	0.01
F6UL68_HORSE	homolog (eV: 1.0e-74) sp Q9MYN8 TTHY_ERIEU Transferrin OS=Erinaceus europaeus GN=TTR... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=TTR PE=3 SV=1	11	11	10.95	7547900.01	9102206.03	953898.03	953898.03	7.91	InVivo	15.91	1.23	14.42	0.32	0.01
F7CSLB_HORSE (A1AT2; 2)*	homolog (eV: 0.0) sp P38029 A1AT2_HORSE Alpha-1-antitrypsinase 2 OS=Equis caballus... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=LOC100065191 PE=3 SV=1	36	12	35.78	11597846.52	13532076.03	1530415.04	1530415.04	7.58	InVivo	16.25	1.45	14.48	0.90	0.02
F7DY34_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P81282 CSPG2_BOVIN Versican core protein OS=Bos taurus GN=VCA... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=VCA PE=4 SV=1	53	53	52.46	16186858.00	12788951.65	2312591.04	2312591.04	7.00	InVivo	16.87	1.17	15.21	0.58	0.01
F6SS57_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q9H0B8 CRLD2_HUMAN Cysteine-rich secretory protein LCCL domain... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=CRISPLD2 PE=4 SV=1	16	16	15.92	2585625.65	2724630.51	382959.22	382959.22	6.75	InVivo	14.74	1.54	13.43	0.53	0.05
F6RM73_HORSE	homolog (eV: 2.0e-52) sp P0D0M6 APOA2_PANTA Apolipoprotein A- II OS=Panthera tigris alt... Apolipoprotein A-II OS=Equis caballus GN=APOA2 PE=4 SV=1	8	5	7.95	2237163.28	2359341.42	345932.81	345932.81	6.47	InVivo	14.77	1.19	13.28	0.67	0.01
F7CYR1_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P01008 ANT3_HUMAN Antithrombin-III OS=Homo sapiens GN=SERPIN... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=SERPIN C1 PE=3 SV=1	50	22	49.72	29401582.55	28987432.26	4628500.49	4628500.49	6.35	InVivo	17.55	0.87	15.87	0.65	0.00
F6XA38_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q02952 AKA12_HUMAN A-kinase anchor protein 12 OS=Homo sapiens... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=AKAP12 PE=4 SV=1	7	7	6.91	434360.89	442539.54	68379.95	68379.95	6.35	InVivo	13.17	1.17	11.44	1.02	0.01
F7BFJ1_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q19A28 THRB_PIG Prothrombin OS=Sus scrofa GN=F2 PE=2 SV=1 Prothrombin OS=Equis caballus GN=F2 PE=3 SV=1	16	16	15.93	2224419.44	1863524.85	350553.48	350553.48	6.35	InVivo	14.94	0.99	13.44	0.20	0.00
sp Q28372 GELS _HORSE-F7DZE1 _HORSE-F7E3D1 _HORSE	Gelsolin OS=Equis caballus GN=GSN PE=1 SV=2	23	23	22.80	2826393.87	3299757.93	455076.33	455076.33	6.21	InVivo	14.95	1.26	13.58	0.57	0.02
F6RYF9_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q9Y6X5 ENPP4_HUMAN Bis(5'-adenosyl)- triphosphatase ENPP4 OS=H... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=ENPP4 PE=4 SV=1	5	5	4.96	87121.93	63373.97	14782.20	14782.20	5.89	InVivo	11.77	0.92	9.96	0.89	0.00
F6PPQD_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q863A0 CD2_GORGO Complement C2 OS=Gorilla gorilla gorilla GN=... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=C2 PE=3 SV=1	8	7	7.92	526068.85	560617.87	100907.15	100907.15	5.21	InVivo	13.47	0.91	12.18	0.29	0.00
F6ZLR1_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q5R536 AACT_PONAB Alpha-1-antichymotrypsin OS=Pongo abelli GN=... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=LOC100053600 PE=3 SV=1	7	7	6.93	387115.31	408211.22	88846.16	88846.16	4.36	InVivo	13.10	1.08	11.85	0.70	0.02
F7CDX7_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P81601 PGBM_HUMAN Basement membrane-specific heparan sulfate ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=HSPG2 PE=4 SV=1	144	139	142.89	70201112.08	46263573.71	16764154.21	16764154.21	4.19	InVivo	18.40	1.09	17.18	0.64	0.03
F6Z64D_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q08DQ2 GFPT2_BOVIN Glutamine-fructose-6-phosphate aminotrans... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=GFPT2 PE=4 SV=1	6	1	5.95	343186.67	226135.43	106713.62	106713.62	3.22	InVivo	13.29	0.57	11.90	1.09	0.01

Accession (Protein Group; n Members)	Description	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	In-Vivo		In-Vitro		Max fold change	Highest mean condition	In-Vivo (ArcSinhT)		In-Vitro (ArcSinhT)		Anova (p)
					Mean	SD	Mean	SD			Mean	SD	Mean	SD	
F6SK35_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp AGK0M2 CXA1_URSAM Gap junction alpha-1 protein OS=Ursus americanus... Gap junction protein OS=Equis caballus GN=CXA3 PE=3 SV=1	10	10	9.90	6895704.64	2647464.63	2301746.25	2301746.25	3.00	InVivo	16.37	0.40	15.00	0.94	0.00
K9KD82_HORSE; K9KEE8_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp B6CUD7 ERO1A_PIG ERO1-like protein alpha OS=Sus scrofa GN=ERO... ERO1-like protein alpha-like protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=2 SV=1	18	2	17.85	801735.25	472381.80	265844.41	265844.41	2.97	InVivo	14.10	0.71	12.32	1.95	0.04
F7DU87_HORSE	homolog (eV: 1.0e-55) sp Q9EDR5 BPIA2_HUMAN BPI fold- containing family A member 2 OS=H... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=BPIA2 PE=4 SV=1 [F7DU87_HORSE,Q9PMN3_HORSE]	3	3	2.99	197255.03	139495.38	75961.70	75961.70	2.60	InVivo	12.65	0.76	11.36	1.27	0.04
sp Q8MIPO FRH... HORSE;F6WXX... HORSE	Ferritin heavy chain OS=Equis caballus GN=FRH1 PE=2 SV=3	35	35	34.77	29142480.70	7616497.83	11941046.76	11941046.76	2.44	InVivo	17.85	0.27	16.80	0.70	0.00
F7BHG1_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q13451 FKBP5_HUMAN Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5 ... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=FKBP5 PE=4 SV=1	11	11	10.84	1771167.11	1141093.35	785188.93	785188.93	2.26	InVivo	14.90	0.64	13.91	1.02	0.05
F6V2X7_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp O77588 PLOD1_BOVIN Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxyg... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=PLOD1 PE=4 SV=1	8	8	7.95	1454188.64	886775.53	662231.75	662231.75	2.20	InVivo	14.72	0.61	13.78	0.95	0.05
F6UP75_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q1KME6 RAB6A_CHICK Ras-related protein Rab-6A OS=Gallus gallu... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=LOC10065545 PE=3 SV=1	3	2	2.98	675839.80	307635.88	311001.00	311001.00	2.17	InVivo	14.03	0.46	13.11	0.85	0.03
Q97678_HORSE	homolog (eV: 1.0e-27) sp P27425 TRFE_HORSE Serotransferrin OS=Equis caballus GN=TF PE=... Transferrin (Fragment) OS=Equis caballus PE=4 SV=1 [Q97678_HORSE,Q97973_HORSE]	2	1	1.94	0.00	0.00	14864.55	14864.55	Infinity	InVivo	0.00	0.00	7.06	4.93	0.00
F6QH4Q_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q9WUD9 SRC_RAT Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src OS=... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=SRC PE=4 SV=1	3	1	2.99	0.00	0.00	1411.81	1411.81	Infinity	InVivo	0.00	0.00	4.77	4.48	0.02
F6QJ90_HORSE; F6RCTS_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q0VCD2 TBG1_BOVIN Tubulin gamma-1 chain OS=Bos taurus GN=TUBG... Tubulin gamma chain OS=Equis caballus GN=LOC100652586 PE=3 SV=1 [F6QJ90_HORSE,F6RCTS_HORSE]	2	1	1.99	0.00	0.00	2560.16	2560.16	Infinity	InVivo	0.00	0.00	4.86	4.64	0.02
F7DL86_HORSE; F6KY2_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp O76013 KRT36_HUMAN Keratin, type I cuticular Ha6 OS=Homo sap... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=KRT36 PE=3 SV=1	10	1	9.96	0.03	0.07	34227.28	34227.28	1065071.25	InVivo	0.03	0.07	5.07	5.38	0.03
F7CQ97_HORSE	homolog (eV: 2.0e-71) sp Q8IU66 H2A2B_HUMAN Histone H2A type 2-B OS=Homo sapiens GN=H2A... Histone H2A OS=Equis caballus GN=H2A2B PE=3 SV=1	2	1	1.99	4268.29	3971.29	260497.25	260497.25	61.03	InVivo	8.69	0.93	11.17	2.89	0.05
zz ZZ_FGC2Cont... Q255 (FETUA; 2)	FETUA_BOVIN Alpha-2-HS-glycoprotein precursor (Fetuin-A) (Asialofetuin) - Bos taurus (Bovine)	12	12	11.84	205415.80	78384.70	11335992.20	11335992.20	55.19	InVivo	12.87	0.36	15.16	2.06	0.01
sp P00559 PGK... HORSE	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Equis caballus GN=PGK1 PE=1 SV=2	60	2	59.56	3881.99	3137.80	201356.27	201356.27	51.87	InVivo	8.73	0.71	11.08	2.28	0.02
F6VH14_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q99M73 KRT84_MOUSE Keratin, type II cuticular Hb4 OS=Mus mus... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=KRT84 PE=3 SV=1	7	4	6.83	1237.18	957.69	63963.69	63963.69	51.70	InVivo	6.67	3.01	9.92	2.15	0.04
F7D4V9_HORSE	homolog (eV: 7.0e-72) sp P68096 CYC_EQUUBU Cytochrome c OS=Equis burchelli GN=CYC5 PE=1... Cytochrome c OS=Equis caballus GN=CYC5 PE=3 SV=1	4	1	3.98	363.05	620.81	15620.94	15620.94	43.03	InVivo	2.24	3.83	8.53	2.04	0.00
F6Q6W4_HORSE	homolog (eV: 5.0e-87) sp O02772 FABPH_PIG Fatty acid-binding protein, heart OS=Sus scr... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=FABP3 PE=3 SV=1	3	3	2.98	2640.86	1999.83	105984.34	105984.34	40.13	InVivo	8.10	1.34	11.84	1.16	0.00
F7BAI2_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q6FHJ7 SFRP4_HUMAN Secreted frizzled-related protein 4 OS=Homo... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=SFRP4 PE=4 SV=1	6	6	5.97	27334.51	25961.16	942808.27	942808.27	34.49	InVivo	10.59	0.82	14.06	1.03	0.00
zz ZZ_FGC2Cont... Q169	sp B8045 p1r 1505602 keratin K7, type II, epithelial, 55K - human	10	2	9.87	2760.02	1927.58	84916.45	84916.45	30.77	InVivo	8.35	0.85	10.48	2.42	0.05
F6QSA6_HORSE	homolog (eV: 1.0e-91) sp Q9BQJ0 AIF1L_HUMAN Allograft inflammatory factor 1-like OS=Homo... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=AIF1L PE=4 SV=1	3	3	2.96	2934.53	2671.56	74959.83	74959.83	25.54	InVivo	6.34	4.36	11.47	1.13	0.01
F6Y47_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P20250 BTF3_HUMAN Transcription factor BTF3 OS=Homo sapiens GN=... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=BTF3 PE=4 SV=1	3	3	2.99	7981.79	7730.28	180068.24	180068.24	22.56	InVivo	9.34	0.86	12.31	1.08	0.00
F6SA01_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q0PDS3 CCND2_BOVIN G1/S-specific cyclin D2 OS=Bos taurus GN=C... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=CCND2 PE=3 SV=1	2	2	1.99	680.94	725.50	13870.26	13870.26	20.37	InVivo	6.78	1.04	9.51	1.54	0.00
F6R830_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q43155 FLRT2_HUMAN Leuconin repeat transmembrane protein ... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=FLRT2 PE=4 SV=1	4	4	3.93	6875.64	7287.12	134007.36	134007.36	19.49	InVivo	8.86	1.33	12.08	0.96	0.00
F6V205_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q99523 SORT_HUMAN Sortilin OS=Homo sapiens GN=SORT1 PE=1 SV=3 Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=SORT1 PE=4 SV=1	2	2	1.99	2679.03	4032.17	45200.36	45200.36	16.87	InVivo	5.78	4.21	10.59	1.55	0.02
F7AIJ2_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q9WVC5 MTNB_MOUSE Methylthioribulose-1-phosphate dehydratase ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=APIP PE=3 SV=1	2	2	1.99	1497.85	1827.45	23918.75	23918.75	15.97	InVivo	4.76	4.50	10.11	1.48	0.01

Accession (Protein Group; n Members)	Description	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	In-Vivo		In-Vitro		Max fold change	Highest mean condition	In-Vivo (ArcSinhYp)		In-Vitro (ArcSinhYp)		Anova (p)
					Mean	SD	Mean	SD			Mean	SD	Mean	SD	
F6SIC3_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q15427 SF3B4_HUMAN Splicing factor 3B subunit 4 OS=Homo sapien... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=SF3B4 PE=4 SV=1	4	4	3.99	4379.87	5499.57	69836.58	69836.58	15.94	InVitro	8.13	1.80	10.85	2.06	0.02
F7C6S0_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q99542 MMP19_HUMAN Matrix metalloproteinase-19 OS=Homo sapien... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=MMP19 PE=4 SV=1	10	10	9.86	142962.28	154091.11	1981317.27	1981317.27	13.86	InVitro	11.98	1.32	14.93	0.83	0.00
F6TDM1_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P17714 ASN5_MESAU Asparagine synthetase [glutamine- hydrolyzin... Asparagine synthetase OS=Equis caballus GN=ASN5 PE=4 SV=1	14	14	13.86	62507.49	51317.92	811991.50	811991.50	12.99	InVitro	11.32	1.10	13.83	1.28	0.00
F6WVX4_HORSE; F6T99_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P52569 CTR2_HUMAN Cationic amino acid transporter 2 OS=Homo s... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=SLC7A2 PE=4 SV=1	2	2	1.99	2455.77	2131.05	31891.29	31891.29	12.99	InVitro	8.16	0.91	10.49	1.34	0.00
F6XEW8_HORSE	homolog (eV: 7.0e-97) sp Q27W01 RBM8A_RAT RNA-binding protein 8A OS=Rattus norvegicus ... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=RBM8A PE=4 SV=1	2	2	1.99	4916.54	5506.03	62751.02	62751.02	12.76	InVitro	8.49	1.54	11.11	1.79	0.01
F6TGH5_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q9UNN5 FAF1_HUMAN FAS-associated factor 1 OS=Homo sapiens GN=... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=FAF1 PE=4 SV=1	2	2	1.99	318.44	842.51	4042.23	4042.23	12.69	InVitro	1.20	3.18	6.60	4.52	0.02
F6SM66_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q9GL72 RNZ2_PANTR Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2 OS=Pa... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=ELAC2 PE=4 SV=1 [F6SM66_HORSE,F6SM75_HORSE,F6SM82_H ORSE]	6	4	5.80	1109.24	1470.52	12805.79	12805.79	11.54	InVitro	5.37	3.80	9.09	2.42	0.05
K9K236_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q3ZC19 TCPQ_BOVIN T- complex protein 1 subunit theta OS=Bos ta... T- complex protein 1 subunit theta-like protein OS=Equis caballus PE=2 SV=1	30	1	29.69	13388.11	14645.75	149155.74	149155.74	11.14	InVitro	8.44	3.25	11.69	1.92	0.04
F7DQ79_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P41219 PER1_HUMAN Peripherin OS=Homo sapiens GN=PRPH PE=1 SV=2 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=PRPH PE=3 SV=1	9	1	8.91	2618.00	2666.99	26507.18	26507.18	10.12	InVitro	8.20	0.89	10.71	0.60	0.00
F6VY61_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q500M6 GPR56_GORGO G-protein coupled receptor 56 OS=Gorilla g... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=GPR56 PE=4 SV=1	3	3	2.95	23625.52	23484.90	213831.62	213831.62	9.05	InVitro	10.35	0.97	12.04	1.73	0.04
F6XIL8_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P40938 RFC3_HUMAN Replication factor C subunit 3 OS=Homo sapi... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=RFC3 PE=4 SV=1 [F6XIL8_HORSE,K9K3M4_HORSE]	3	3	2.99	1745.82	3435.07	15664.83	15664.83	8.97	InVitro	3.58	4.56	8.74	3.95	0.04
F6ZPB8_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q5VT00 T39B_HUMAN Tetratricopeptide repeat protein 39B OS=Ho... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=T39B PE=4 SV=1 [F6ZPB8_HORSE,K9KGE7_HORSE]	2	2	1.95	3223.32	4257.73	28068.57	28068.57	8.71	InVitro	7.06	3.35	10.85	0.46	0.01
F7CGI0_HORSE	homolog (eV: 2.0e-79) sp P49207 RL34_HUMAN 60S ribosomal protein L34 OS=Homo sapiens G... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=RPL34 PE=4 SV=1	3	3	2.94	6203.82	8188.70	51271.15	51271.15	8.26	InVitro	7.29	3.64	10.80	1.19	0.03
F6PMY4_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q07954 LRP1_HUMAN Prolow-density lipoprotein receptor-related... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=LRP1 PE=4 SV=1	6	6	5.90	14502.88	21646.29	114304.95	114304.95	7.88	InVitro	9.50	1.35	11.93	1.09	0.00
F7DSD9_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q13155 AIMP2_HUMAN Aminoacyl tRNA synthase complex-interactin... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=AIMP2 PE=4 SV=1	5	5	4.98	4465.32	4896.38	34785.55	34785.55	7.79	InVitro	8.48	1.36	10.41	1.53	0.03
F6RIW1_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q5SWU9 ACACA_MOUSE Acetyl-CoA carboxylase 1 OS=Mus musculus G... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=ACACA PE=4 SV=1	12	12	11.85	31694.56	20217.51	244751.58	244751.58	7.72	InVitro	10.86	0.71	12.88	0.71	0.00
K9KAK2_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q95573 ACSL3_HUMAN Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 3 OS=Hom... Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 3-like protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=2 SV=1	2	1	1.99	4177.52	4801.11	31066.68	31066.68	7.44	InVitro	8.54	1.11	10.76	0.93	0.00
F7A2CS_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q8WTS6 SETD7_HUMAN Histone-lysine N- methyltransferase SETD7 O... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=SETD7 PE=4 SV=1	3	3	2.92	17587.65	13928.23	125730.05	125730.05	7.15	InVitro	9.48	2.68	12.13	0.88	0.03
F7B812_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q92743 HTRA1_HUMAN Serine protease HTRA1 OS=Homo sapiens GN=H... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=HTRA1 PE=4 SV=1	10	10	9.95	50245.01	37217.67	358207.73	358207.73	7.13	InVitro	11.15	1.09	12.83	1.39	0.03
F7DGI9_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q09161 NCBP1_HUMAN Nuclear cap- binding protein subunit 1 OS=H... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=NCBP1 PE=4 SV=1	5	5	4.89	4913.70	11677.29	34386.72	34386.72	7.00	InVitro	6.46	3.32	9.75	2.27	0.05
F6V6F7_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q5RAF4 NEU1_PONAB Sialidase-1 OS=Pongo abelli GN=NEU1 PE=2 SV=1 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=NEU1 PE=4 SV=1	3	3	2.98	6418.25	3501.71	44517.10	44517.10	6.94	InVitro	9.27	0.75	10.89	1.21	0.01
F6WB94_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q5R762 CSN7A_PONAB COP9 signalosome complex subunit 7a OS=Pon... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=COP97A PE=4 SV=1	2	2	1.99	212.14	560.91	1438.57	1438.57	6.78	InVitro	1.25	2.99	6.50	3.09	0.01

Accession (Protein Group; n Members)	Description	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	In-Vivo		In-Vitro		Max fold change	Highest mean condition	In-Vivo (ArcSinhYp)		In-Vitro (ArcSinhYp)		Anova (p)
					Mean	SD	Mean	SD			Mean	SD	Mean	SD	
F6W843_HORSE	homolog (eV: 1.0e-83) sp P83917 CBX1_MOUSE Chromobox protein homolog 1 OS=Mus musculus... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=CBX1 PE=4 SV=1	2	1	1.99	1151.07	1216.83	7609.03	7609.03	6.61	InVitro	6.42	3.00	9.25	1.09	0.04
F7DN83_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q8T934 ACOD_BOVIN Acyl-CoA desaturase OS=Bos taurus GN=SCD PE... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=SCD PE=3 SV=1	4	4	3.99	34910.38	47457.04	227001.56	227001.56	6.50	InVitro	10.61	1.04	12.89	0.58	0.00
F7C959_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q3ZC09 ENOB_BOVIN Beta-enolase OS=Bos taurus GN=ENO3 PE=2 SV=1 Enolase 3 OS=Equis caballus GN=ENO3 PE=2 SV=1	23	4	22.92	24801.15	51360.73	158350.42	158350.42	6.38	InVitro	9.52	1.53	11.78	1.66	0.02
zz ZZ_FGCZCont 0089 zz ZZ_FG CZCont0221	g 417200 sp P08727 K1C5_HUMAN KERATIN, TYPE I CYTOSKELETAL 19 (CYTOK zz ZZ_FGCZCont0089 zz ZZ_FGCZCont0221)	21	4	20.88	342.31	271.48	2178.83	2178.83	6.37	InVitro	6.05	1.21	7.77	1.17	0.02
F6YT19_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q0VC24 WDR12_BOVIN Ribosome biogenesis protein WDR12 OS=Bos t... Ribosome biogenesis protein WDR12 OS=Equis caballus GN=WDR12 PE=3 SV=1	5	5	4.85	9220.12	9676.52	58568.36	58568.36	6.35	InVitro	9.14	1.48	11.07	1.40	0.03
F7AH79_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q498M4 WDR5_RAT WD repeat-containing protein 5 OS=Rattus norv... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=WDR5 PE=4 SV=1	2	2	1.99	12015.48	11345.09	74601.51	74601.51	6.21	InVitro	9.56	1.21	11.22	1.45	0.04
F6RZ63_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q70437 SMAD4_RAT Mothers against decapentaplegic homolog 4 OS... Mothers against decapentaplegic homolog OS=Equis caballus GN=SMAD4 PE=3 SV=1	3	3	2.98	5819.28	5297.91	35130.32	35130.32	6.04	InVitro	8.86	1.27	10.52	1.42	0.04
F7CEE6_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q9BPW9 DHR59_HUMAN Dehydrogenase/reductase SDR family member... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=DHR59 PE=3 SV=1	7	6	6.96	32513.84	27740.92	183807.74	183807.74	5.65	InVitro	10.70	1.03	12.49	0.91	0.00
F65517_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q58106 CSTF1_RAT Cleavage stimulation factor subunit 1 OS=Rat... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=CSTF1 PE=4 SV=1	2	2	1.99	4835.92	5179.54	27235.76	27235.76	5.63	InVitro	7.43	3.53	10.46	1.22	0.05
F6ZUA1_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q2KH6 CRYM_BOVIN Ketimine reductase mu-crystallin OS=Bos tau... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=CRYM PE=4 SV=1	8	8	7.92	201293.72	99482.69	1097583.55	1097583.55	5.45	InVitro	12.79	0.55	14.48	0.56	0.00
F6U276_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q6IMX7 HPBP1_RAT Hsp70-binding protein 1 OS=Rattus norvegicus... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=HPBP1 PE=4 SV=1	4	4	3.98	39768.13	33168.68	208073.76	208073.76	5.23	InVitro	10.95	0.92	12.72	0.79	0.00
F6Z6X7_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q0V8E7 STRAG_BOVIN Stimulated by retinoic acid gene 6 protein... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=STRAG PE=4 SV=1	7	6	6.89	36871.18	30496.69	190628.73	190628.73	5.17	InVitro	10.98	0.70	12.38	1.09	0.01
F6ZG42_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q43592 XPOT_HUMAN Exportin-T OS=Homo sapiens GN=XPOT PE=1 SV=2 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=XPOT PE=4 SV=1	7	7	6.93	39185.80	36479.94	199824.43	199824.43	5.10	InVitro	10.91	0.91	12.78	0.54	0.00
F7E0P3_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P35443 TSP4_HUMAN Thrombospondin-4 OS=Homo sapiens GN=THB54 P... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=THB54 PE=4 SV=1	13	11	12.92	178725.67	240244.48	883570.65	883570.65	4.94	InVitro	11.93	1.59	13.65	1.42	0.05
F7DW21_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q15067 PURA_HUMAN Phosphoribosylformylglycinamide synthase ... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=PFAS PE=4 SV=1	8	8	7.82	66763.65	65345.35	298325.39	298325.39	4.47	InVitro	11.31	1.12	12.90	1.14	0.02
F6Y2W6_HORSE; K9KF23_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P41252 SYIC_HUMAN Isolucine-tRNA ligase, cytoplasmic OS=Hom... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=IARS PE=3 SV=1	15	15	14.88	125133.44	103453.86	551467.28	551467.28	4.41	InVitro	12.12	0.87	13.49	1.12	0.03
F6U072_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q8N766 EMC1_HUMAN ER membrane protein complex subunit 1 OS=Ho... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=EMC1 PE=4 SV=1	7	7	6.95	26721.54	16216.59	117444.32	117444.32	4.40	InVitro	10.71	0.66	11.99	1.11	0.02
F7CDI5_HORSE;F 6VG24_HORSE;K 9KAB4_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q9BKJ9 NAA15_HUMAN N-alpha- acetyltransferase 15, Naa15a... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=NAA15 PE=4 SV=1 [F7CDI5_HORSE;K9KAB4_HORSE]	6	6	5.91	36389.13	36191.59	155802.29	155802.29	4.28	InVitro	10.78	1.03	12.26	1.15	0.03
F7C5H6_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P29728 OAS2_HUMAN 2'-5'-oligoadenylate synthase 2 OS=Homo sap... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=OAS2 PE=4 SV=1 [F7C5H6_HORSE;F7DSP6_HORSE;Q5MY97_HO RSE;Q6R757_HORSE]	7	7	6.94	96299.88	77783.53	402603.51	402603.51	4.18	InVitro	11.75	1.13	13.13	1.04	0.04
F6YYN8_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q2K128 MCM6_BOVIN DNA replication licensing factor MCM6 OS=Bo... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=MCM6 PE=3 SV=1	7	7	6.97	25201.57	26493.52	104546.62	104546.62	4.15	InVitro	10.38	1.11	11.83	1.03	0.03
F7DQM5_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P43246 MSH2_HUMAN DNA mismatch repair protein Msh2 OS=Homo sa... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=MSH2 PE=3 SV=1	4	4	3.92	7833.71	5756.79	32294.53	32294.53	4.12	InVitro	9.30	1.01	10.83	0.84	0.01
F7DRP9_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q60817 NACA_MOUSE Nascent polypeptide-associated complex subu... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=NACA PE=4 SV=1	4	4	3.99	178915.84	137146.25	715231.97	715231.97	4.00	InVitro	12.48	0.95	13.89	0.83	0.01
F6ZDM5_HORSE	homolog (eV: 2.0e-99) sp P46783 RS10_HUMAN 40S ribosomal protein S10 OS=Homo sapiens G... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=RS10 PE=4 SV=1	4	4	3.98	102116.62	86479.83	405409.50	405409.50	3.97	InVitro	11.63	1.43	13.35	0.79	0.02
F6T323_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P06872 TRY2_CANFA Anionic trypsin OS=Canis familiaris PE=2 SV=1 Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=LOC100055297 PE=3 SV=1	6	1	5.88	395981.54	453181.91	1530835.24	1530835.24	3.87	InVitro	12.98	1.26	14.70	0.78	0.01

Accession (Protein Group; n Members)	Description	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	In-Vivo		In-Vitro		Max fold change	Highest mean condition	In-Vivo (ArcSinhYp)		In-Vitro (ArcSinhYp)		Anova (p)
					Mean	SD	Mean	SD			Mean	SD	Mean	SD	
F6VW08_HORSE; F6VP70_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp A6QDP7 DYSF_BOVIN Dysferlin OS=Bos taurus GN=DYSF PE=2 SV=1 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=DYSF PE=4 SV=1	30	29	29.59	241536.88	99268.12	933700.15	933700.15	3.87	InVitro	13.02	0.40	14.01	1.07	0.04
F7CNL3_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q28205 TBCD_BOVIN Tubulin-specific chaperone D OS=Bos taurus ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=TBCD PE=4 SV=1 [F7CNL3_HORSE,F7DFN5_HORSE]	8	8	7.93	25034.31	16352.28	96687.19	96687.19	3.86	InVitro	10.43	1.24	12.02	0.65	0.01
F7AZ73_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q64324 STXB2_MOUSE Syntaxin-binding protein 2 OS=Mus musculus... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=STXB2 PE=4 SV=1	4	4	3.96	11687.91	12710.21	44158.36	44158.36	3.78	InVitro	9.53	1.16	11.00	1.06	0.03
F6SKX4_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q4R4P3 CYBP_MACFA Calcyclin-binding protein OS=Macaca fascicu... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=CACYPB PE=4 SV=1 [F6SKX4_HORSE,K9K129_HORSE,L7MRJ4_HOR SE]	6	6	5.94	375930.35	289658.94	1417506.74	1417506.74	3.77	InVitro	13.20	0.95	14.52	1.00	0.03
F6PVN3_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P41217 OX26_HUMAN OX-2 membrane glycoprotein OS=Homo sapiens ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=CD200 PE=4 SV=1	7	7	6.97	306094.23	129582.70	1142236.87	1142236.87	3.73	InVitro	13.24	0.44	14.54	0.49	0.00
F7E1R0_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q53EP0 FND3B_HUMAN Fibronectin type III domain-containing pro... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=FND3B PE=4 SV=1	10	9	9.87	127874.84	89354.16	474289.28	474289.28	3.71	InVitro	12.22	0.76	13.54	0.82	0.01
F7B906_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q7YQK3 4F2_RABIT 4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Oryc... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=SLC3A2 PE=4 SV=1	17	17	16.86	697228.02	393792.32	2522808.76	2522808.76	3.62	InVitro	13.96	0.72	15.26	0.65	0.00
F7B3T4_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q8TBC4 UBA3_HUMAN NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=UBA3 PE=4 SV=1	3	3	2.94	18858.63	12543.59	66955.65	66955.65	3.55	InVitro	10.24	0.94	11.48	1.04	0.04
F6U768_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P27708 PYR1_HUMAN CAD protein OS=Homo sapiens GN=CAD PE=1 SV=3 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=CAD PE=3 SV=1	5	5	4.98	28275.69	31148.11	98107.31	98107.31	3.47	InVitro	10.38	1.17	11.97	0.78	0.01
H9GZM5_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q8UNF1 MAGED2_HUMAN Melanoma- associated antigen D2 OS=Homo sap... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=MAGED2 PE=4 SV=1	5	4	4.89	72823.73	64133.63	252252.26	252252.26	3.46	InVitro	11.56	0.90	12.89	0.73	0.01
F6UFU0_HORSE	homolog (eV: 2.0e-47) sp Q791B0 UBL5_PSAOB Ubiquitin-like protein 5 OS=Psammonius obesus... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=UBL5 PE=4 SV=1	2	2	1.99	8577.16	9321.97	29324.10	29324.10	3.42	InVitro	8.85	1.75	10.82	0.57	0.02
F7D050_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P55345 EGFR_MACMU Epidermal growth factor receptor OS=Macaca ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=EGFR PE=3 SV=1 [F7D050_HORSE,F7DFR6_HORSE]	9	9	8.92	90820.70	55743.13	309594.38	309594.38	3.41	InVitro	11.92	0.70	13.10	0.78	0.01
F6QPI5_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q82973 TNPO1_HUMAN Transportin-1 OS=Homo sapiens GN=TNPO1 PE=... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=TNPO1 PE=4 SV=1	5	3	4.95	47396.47	45719.54	155982.22	155982.22	3.29	InVitro	10.77	1.46	12.40	0.85	0.03
F7CJ34_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q91V12 BACH_MOUSE Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydroly... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=ACOT7 PE=4 SV=1	4	4	3.99	93230.05	87754.71	304017.07	304017.07	3.26	InVitro	11.76	0.95	13.21	0.51	0.00
F6QFQ3_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q6UX71 PXDC2_HUMAN Plexin domain- containing protein 2 OS=Homo... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=PLXDC2 PE=4 SV=1	4	4	3.92	75311.74	60314.94	239477.87	239477.87	3.18	InVitro	11.63	0.84	12.71	0.96	0.05
F6W8C8_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q5R899 SPB6_PONAB Serpins B6 OS=Pongo abelli GN=SERPINB6 PE=2 ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=SERPINB6 PE=3 SV=1	18	17	17.80	3027828.91	1324586.02	9362595.21	9362595.21	3.09	InVitro	15.53	0.45	16.70	0.34	0.00
F7BT61_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P24547 IMDH2_MOUSE Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 O... Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (Fragment) OS=Equis caballus GN=IMPDH2 PE=3 SV=1 [F7BT61_HORSE,K9K3Y4_HORSE]	6	6	5.98	127209.59	99730.23	391328.15	391328.15	3.08	InVitro	12.01	1.14	13.47	0.50	0.01
K9K4D8_HORSE; F6V7X6_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q5REY6 RHDA_PONAB Transforming protein RhoA OS=Pongo abelli G... Transforming protein RhoA-like protein OS=Equis caballus PE=2 SV=1	14	6	13.95	88315.86	71466.15	270465.18	270465.18	3.06	InVitro	11.84	0.75	12.92	0.88	0.03
K9KFC8_HORSE; F6VLM6_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q60343 TBCD4_HUMAN TBC1 domain family member 4 OS=Homo sapiens... TBC1 domain family member 4-like protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=2 SV=1	2	2	1.99	3029.02	3400.79	9253.31	9253.31	3.05	InVitro	8.02	1.34	9.59	0.82	0.02
F6SUJ2_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q3T105 GALE_BOVIN UDP-glucose 4-epimerase OS=Bos taurus GN=GA... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=GALE PE=3 SV=1	8	8	7.86	202909.95	177891.14	615181.04	615181.04	3.03	InVitro	12.55	0.95	13.77	0.84	0.03
F7DFM9_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P26882 PPID_BOVIN Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D OS=Bo... 40 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like protein OS=Equis caballus GN=PPID PE=2 SV=1	8	8	7.91	133279.52	105423.36	400919.00	400919.00	3.01	InVitro	12.16	0.91	13.35	0.81	0.02
F6VAF4_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp O97758 ZO1_CANFA Tight junction protein ZO-1 OS=Canis familia... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=ZO1 PE=4 SV=1	3	3	2.98	10289.53	8197.18	30869.01	30869.01	3.00	InVitro	9.39	1.40	10.94	0.48	0.02
F7A9G6_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q43175 SERA_HUMAN D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=PHGDH PE=3 SV=1	14	14	13.89	386961.69	516862.32	1158120.37	1158120.37	2.99	InVitro	13.06	0.98	14.31	1.00	0.04

Accession (Protein Group; n Members)	Description	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	In-Vivo		In-Vitro		Max fold change	Highest mean condition	In-Vivo (ArcSinhYp)		In-Vitro (ArcSinhYp)		Anova (p)
					Mean	SD	Mean	SD			Mean	SD	Mean	SD	
F65H8_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp P35908 K22E_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal O... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=LOC10063215 PE=3 SV=1	29	2	28.78	13522.04	34924.91	40075.86	40075.86	2.96	InVitro	5.22	4.34	9.46	1.99	0.04
F6X9U4_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp Q14118 DAG1_HUMAN Dystroglycan OS=Homo sapiens GN=DAG1 PE=1 SV=2 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=DAG1 PE=4 SV=1	13	12	12.84	420487.04	281610.97	1226955.02	1226955.02	2.92	InVitro	13.42	0.77	14.57	0.60	0.01
F6V2H7_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp Q61823 PDCD4_MOUSE Programmed cell death protein 4 OS=Homo mus... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=PDCD4 PE=4 SV=1	11	11	10.88	643755.26	246509.44	1867652.51	1867652.51	2.90	InVitro	14.01	0.38	15.03	0.52	0.00
F6QQH1_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp Q2NL37 BCCIP_BOVIN BRCA2 and CDKN1A-interacting protein OS=Bo... BRCA2 and CDKN1A-interacting protein OS=Equis caballus GN=BCCIP PE=3 SV=1	4	4	3.93	142025.28	82899.17	405989.22	405989.22	2.86	InVitro	12.42	0.55	13.52	0.48	0.00
F6QUJ0_HORSE; K9K2M1_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp Q8TR36 PIP5K_BOVIN Phosphatidylinositol transfer protein beta... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=PIP5K PE=4 SV=1 [F6QUJ0_HORSE;K9K2M1_HORSE]	9	7	8.89	96125.51	41333.42	272400.24	272400.24	2.83	InVitro	12.05	0.60	12.94	0.92	0.05
F6T775_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp Q5670 HIKES_BOVIN Protein HIKESH OS=Bos taurus PE=2 SV=1 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=C11orf73 PE=4 SV=1	4	4	3.93	26189.66	28458.47	74178.11	74178.11	2.83	InVitro	9.14	3.09	11.76	0.56	0.05
F6RTH0_HORSE	homolog (ev: 3.0e-82) sp Q8BRA2 TXD17_HUMAN Thioredoxin domain-containing protein 17 O... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=TXND17 PE=4 SV=1	5	5	4.95	486729.92	304157.67	1377534.63	1377534.63	2.83	InVitro	13.57	0.77	14.64	0.74	0.02
F6TV65_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp P33672 PSB3_BOVIN Proteasome subunit beta type-3 OS=Bos taurus... Proteasome subunit beta type (Fragment) OS=Equis caballus GN=PSMB3 PE=3 SV=1	9	8	8.93	286426.18	268077.35	808954.09	808954.09	2.82	InVitro	12.76	1.15	13.99	1.01	0.05
F6Z0A2_HORSE; F6YU5_HORSE; F6ZP0_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp Q8TEM1 P0210_HUMAN Nuclear pore membrane glycoprotein 210 OS=... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=NUP210 PE=4 SV=1	8	8	7.94	83729.68	44994.73	232341.56	232341.56	2.77	InVitro	11.92	0.48	12.85	0.70	0.01
F7E2E0_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp Q64674 SPEE_MOUSE Spermidine synthase OS=Mus musculus GN=Srm... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=Srm PE=3 SV=1	10	10	9.92	332675.85	129597.26	916853.47	916853.47	2.76	InVitro	13.31	0.54	14.23	0.73	0.02
F6WUJ4_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp P50518 VATE1_MOUSE V-type proton ATPase subunit E 1 OS=Mus mus... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=VATE1 PE=3 SV=1	3	2	2.99	4000.69	5446.35	10954.86	10954.86	2.74	InVitro	8.25	1.34	9.73	0.84	0.03
F6W1A9_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp Q35344 INAA_MOUSE Importin subunit alpha-4 OS=Mus musculus GN=... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=KPNB3 PE=4 SV=1	9	7	8.79	134632.18	99822.02	363232.01	363232.01	2.70	InVitro	12.18	0.94	13.22	0.88	0.05
F6WZ9_HORSE; F7DTR4_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp Q98873 ANM1_HUMAN Protein arginine N-methyltransferase 1 OS=H... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=PRMT1 PE=4 SV=1	19	19	18.80	832389.50	416518.21	2216147.73	2216147.73	2.66	InVitro	14.24	0.41	15.25	0.35	0.00
F7CQT0_HORSE; F7DDN1_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp P49327 FAS_HUMAN Fatty acid synthase OS=Homo sapiens GN=FASN... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=FASN PE=4 SV=1	86	85	85.29	6503658.76	3915223.00	17140712.84	17140712.84	2.64	InVitro	16.20	0.69	17.30	0.34	0.00
F6V9Q3_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp P62755 R56_RAT 40S ribosomal protein S6 OS=Rattus norvegicus ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=R56 PE=4 SV=1	2	2	1.99	78319.36	68942.13	206293.23	206293.23	2.63	InVitro	11.56	1.02	12.77	0.63	0.02
F7D6N6_HORSE; K9KFT9_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp Q8R79 IFAG2_PONAB Eukaryotic translation initiation factor 4... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=EIF4G2 PE=4 SV=1	10	10	9.82	66747.95	59387.31	175270.45	175270.45	2.63	InVitro	11.38	1.05	12.57	0.80	0.03
K9KFA1_HORSE; F6YKY8_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp Q13564 ULAI_HUMAN NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subun... NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit-like protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=2 SV=1	4	4	3.98	10638.75	15167.17	27865.65	27865.65	2.62	InVitro	9.22	1.31	10.79	0.58	0.01
F6Q7V4_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp P47788 THOP1_PIG Thimet oligopeptidase OS=Sus scrofa GN=THOP1... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=THOP1 PE=3 SV=1 [F6Q7V4_HORSE;F6REH4_HORSE]	4	4	3.97	37511.88	34735.58	98176.62	98176.62	2.62	InVitro	10.91	0.84	11.91	0.91	0.05
F7AIG1_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp Q2KIG3 SYNC_BOVIN Asparagine-tRNA ligase, cytoplasmic OS=Bos... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=NARS PE=3 SV=1	9	9	8.91	388866.30	270487.96	1001250.80	1001250.80	2.57	InVitro	13.36	0.70	14.39	0.55	0.01
F6YZZ3_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp P11172 UMPS_HUMAN Uridine 5'-monophosphate synthase OS=Homo s... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=UMPS PE=2 SV=1	2	2	1.99	51038.74	62392.08	130713.66	130713.66	2.56	InVitro	10.46	1.96	12.43	0.33	0.02
F6YTK4_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp Q9P2J5 SVLC_HUMAN Leucine-tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo s... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=LARS PE=3 SV=1	5	4	4.93	72468.17	46178.52	185267.20	185267.20	2.56	InVitro	11.70	0.68	12.67	0.65	0.02
zz ZZ_FGC2Cont 0068	sp CTRB_BOVIN	8	8	7.83	6910296.91	6901073.26	17587305.81	17587305.81	2.55	InVitro	16.09	0.88	17.18	0.74	0.03
sp Q9GM50 UC HL1_HORSE	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 OS=Equis caballus GN=UCHL1 PE=2 SV=2	6	4	5.95	168765.72	225838.91	429452.69	429452.69	2.54	InVitro	12.18	1.05	13.51	0.60	0.01
F6UAB6_HORSE	homolog (ev: 0.0) sp Q95433 AHS1_HUMAN Activator of 90 kDa heat shock protein ATP... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=AHS1 PE=4 SV=1	5	4	4.94	326176.00	237946.15	827262.54	827262.54	2.54	InVitro	13.09	0.92	14.18	0.61	0.02
F6Y508_HORSE	homolog (ev: 2.0e-79) sp Q2KIA2 TR112_BOVIN Multifunctional methyltransferase subunit ... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=TRMT112 PE=4 SV=1	2	2	1.99	246327.59	188131.11	622827.51	622827.51	2.53	InVitro	12.67	1.18	13.98	0.37	0.02

Accession (Protein Group; n Members)	Description	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	In-Vivo		In-Vitro		Max fold change	Highest mean condition	In-Vivo (ArcSinhYp)		In-Vitro (ArcSinhYp)		Anova (p)
					Mean	SD	Mean	SD			Mean	SD	Mean	SD	
F6U5F4_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P49915 GUAH_HUMAN GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] OS=Homo... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=GMP5 PE=4 SV=1	20	20	19.76	413726.37	219965.14	1043368.56	1043368.56	2.52	InVitro	13.49	0.58	14.46	0.48	0.01
F7D153_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q21BW0 ATX10_BOVIN Ataxin-10 OS=Bos taurus GN=ATX10 PE=2 SV=1 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=ATX10 PE=4 SV=1	8	8	7.92	117910.50	100261.30	293026.90	293026.90	2.49	InVitro	12.00	0.99	13.11	0.65	0.03
F6YK2_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P32969 RL9_HUMAN 60S ribosomal protein L9 OS=Homo sapiens GN=... 60S ribosomal protein L9-like protein OS=Equis caballus GN=RL9 PE=2 SV=1	5	5	4.99	280078.90	191494.68	693093.07	693093.07	2.47	InVitro	13.05	0.64	13.95	0.72	0.03
F6X8C3_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q9P258 RCC2_HUMAN Protein RCC2 OS=Homo sapiens GN=RCC2 PE=1 SV=2 Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=RCC2 PE=4 SV=1	2	2	1.99	29964.08	24796.52	73389.83	73389.83	2.45	InVitro	10.60	1.11	11.73	0.64	0.04
F655E7_HORSE;F 6QGT2_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q32BV8 SYTC_BOVIN Threonine-tRNA ligase, cytoplasmic OS=Bos ... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=TARS PE=3 SV=1	22	21	21.89	1370826.48	524250.12	3349977.03	3349977.03	2.44	InVitro	14.76	0.40	15.64	0.46	0.00
F7E3R8_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P38408 GNA14_BOVIN Guanine nucleotide-binding protein subunit... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=GNA14 PE=4 SV=1	5	3	4.96	93736.98	157310.68	228325.75	228325.75	2.44	InVitro	11.35	1.22	12.87	0.64	0.01
K9K3L3_HORSE;F 7CM84_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q5RBL1 SYG_PONAB Glycine-tRNA ligase OS=Pongo abelli GN=GARS... Glycyl-tRNA synthetase-like protein (Fragment) OS=Equis caballus PE=2 SV=1	15	15	14.74	586615.37	305734.28	1428716.30	1428716.30	2.44	InVitro	13.83	0.61	14.71	0.64	0.02
F7AK40_HORSE; K9K9B8_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp B5DF89 CUL3_RAT Cullin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Cul3 PE=1 SV=2 Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=CUL3 PE=3 SV=1	5	5	4.89	84473.28	70910.48	203396.07	203396.07	2.41	InVitro	11.71	0.90	12.89	0.24	0.01
F6YNM7_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P48147 PPCE_HUMAN Prolyl endopeptidase OS=Homo sapiens GN=PRE... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=PREP PE=4 SV=1	10	10	9.87	514605.34	277800.96	1227222.56	1227222.56	2.38	InVitro	13.69	0.64	14.56	0.63	0.02
F6RTT8_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P26369 U2AF2_MOUSE Splicing factor U2AF 65 kDa subunit OS=Mus... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=U2AF2 PE=4 SV=1	12	12	11.89	869338.15	582119.55	2051455.84	2051455.84	2.36	InVitro	14.18	0.66	15.15	0.43	0.01
F7BTP3_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q484U9 SYSC_MACFA Serine-tRNA ligase, cytoplasmic OS=Macaca ... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=SARS PE=3 SV=1	7	7	6.90	215117.75	157066.46	503980.33	503980.33	2.34	InVitro	12.65	0.94	13.71	0.50	0.02
F6VIV2_HORSE	homolog (eV: 1.0e-66) sp P80912 HINT1_RABIT Histidine triad nucleotide-binding protein... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=HINT1 PE=4 SV=1 [F6VIV2_HORSE,K9KBY4_HORSE]	4	4	3.94	637244.13	446691.84	1490405.27	1490405.27	2.34	InVitro	13.74	0.96	14.75	0.67	0.04
F6UIJM0_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P78347 GTF2I_HUMAN General transcription factor II-I OS=Homo ... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=GTF2I PE=4 SV=1 [F6UIJM0_HORSE,F6VNC0_HORSE]	9	9	8.87	479496.17	222560.36	1099769.25	1099769.25	2.29	InVitro	13.67	0.52	14.44	0.63	0.03
F6P147_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P48818 ACADV_BOVIN Very long-chain specific acyl-CoA dehydrog... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=ACADVL PE=3 SV=1	12	12	11.85	696170.19	426548.25	1587046.84	1587046.84	2.28	InVitro	13.91	0.85	14.88	0.48	0.02
F6SCX8_HORSE;F 6QYF7_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P31939 PUR5_HUMAN Bifunctional purine biosynthesis protein PU... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=ATIC PE=4 SV=1	14	11	13.73	417509.81	245047.66	940857.82	940857.82	2.25	InVitro	13.42	0.78	14.41	0.30	0.01
F7C555_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q06AT3 UCHL5_PIG Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozym... Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (Fragment) OS=Equis caballus GN=UCHL5 PE=3 SV=1	23	23	22.83	863787.58	665224.23	1928113.34	1928113.34	2.23	InVitro	14.15	0.66	15.02	0.60	0.02
F6R0H0_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q58DW2 CGL_BOVIN Cystathionine gamma-lyase OS=Bos taurus GN=C... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=CTH PE=3 SV=1	5	5	4.97	108848.85	101014.95	242241.70	242241.70	2.23	InVitro	11.92	0.93	12.93	0.65	0.04
F7D1J3_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q58DW2 CGL_BOVIN Cystathionine gamma-lyase OS=Bos taurus GN=C... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=CTH PE=3 SV=1	29	29	28.80	7495419.71	2613788.86	16566840.87	16566840.87	2.21	InVitro	16.47	0.37	17.28	0.29	0.00
F6YLB4_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q96FW1 OTUB1_HUMAN Ubiquitin thioesterase OTUB1 OS=Homo sapie... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=OTUB1 PE=4 SV=1	12	12	11.90	541119.95	455109.43	1171315.08	1171315.08	2.16	InVitro	13.51	1.01	14.56	0.54	0.03
F6WCY9_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P10775 RINI_PIG Ribonuclease inhibitor OS=Sus scrofa GN=RNH1 ... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=RNH1 PE=4 SV=1	28	28	27.69	1865312.37	675964.22	4020196.78	4020196.78	2.16	InVitro	15.06	0.43	15.76	0.63	0.03
F6SIZ6_HORSE;F 6TAG7_HORSE;F 6XCZ2_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P60892 PRPS1_RAT Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 OS=Ratt... Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1-like protein OS=Equis caballus GN=PRPS1 PE=2 SV=1	5	5	4.98	166059.96	101530.24	357841.37	357841.37	2.15	InVitro	12.51	0.72	13.42	0.42	0.01
F6WC66_HORSE; F6T431_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q14195 DPYL3_HUMAN Dihydropyrimidinase-related protein 3 OS=H... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=DPYL3 PE=4 SV=1	49	44	48.65	27714509.87	18354115.40	59117155.75	59117155.75	2.13	InVitro	17.67	0.59	18.52	0.39	0.01
F6ZER8_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp A2VE52 ORN_BOVIN Oligoribonuclease, mitochondrial OS=Bos taur... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=REXQ2 PE=3 SV=1	12	12	11.89	1189471.13	470573.52	2533409.64	2533409.64	2.13	InVitro	14.61	0.43	15.29	0.59	0.03
F6TGA5_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q5RE13 RAB1B_PONAB Ras-related protein Rab-1B OS=Pongo abelli... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=RAB1B PE=3 SV=1	11	3	10.93	252055.15	158407.13	534652.69	534652.69	2.12	InVitro	12.95	0.65	13.78	0.49	0.02

Accession (Protein Group; n Members)	Description	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	In-Vivo		In-Vitro		Max fold change	Highest mean condition	In-Vivo (ArcSinhYp)		In-Vitro (ArcSinhYp)		Anova (p)
					Mean	SD	Mean	SD			Mean	SD	Mean	SD	
F6WY23_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q92044 TXNL1_RAT Thioredoxin-like protein 1 OS=Rattus norvegicus Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=TXNL1 PE=4 SV=1 [F6WY23_HORSE_K9KEM1_HORSE]	14	14	13.90	1815592.86	899719.25	3822681.88	3822681.88	2.11	InVitro	14.99	0.51	15.69	0.64	0.04
F6R393_HORSE;F7 BNIN7_HORSE;F7 E0W2_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q35WY6 STK25_BOVIN Serine/threonine-protein kinase 25 OS=Bos ... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=STK25 PE=4 SV=1	3	3	2.99	121880.23	68200.60	255896.65	255896.65	2.10	InVitro	12.14	0.95	13.04	0.48	0.05
F7CZK0_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q9UBT2 SAE2_HUMAN SUMO-activating enzyme subunit 2 OS=Homo sapiens Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=UBA2 PE=3 SV=1	3	3	2.95	79790.12	64400.45	167476.34	167476.34	2.10	InVitro	11.78	0.63	12.68	0.33	0.01
F6XTN1_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P60843 IF4A1_MOUSE Eukaryotic initiation factor 4A-1 OS=Mus m... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=EIF4A1 PE=3 SV=1	31	17	30.82	3652433.77	1405463.52	7643293.97	7643293.97	2.09	InVitro	15.74	0.38	16.47	0.46	0.01
F7A257_HORSE	homolog (eV: 9.0e-90) sp P68027 UBZL3_MOUSE Ubiquitin- conjugating enzyme E2 L3 OS=Mus ... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=UBE2L3 PE=3 SV=1	8	8	7.85	761055.33	431381.78	1584301.70	1584301.70	2.08	InVitro	14.06	0.68	14.89	0.46	0.02
F7C883_HORSE;F7 6RGJ5_HORSE;F7 B439_HORSE;F7 BBA0_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp P62961 YBQX1_RAT Nuclease-sensitive element-binding protein 1... Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=YBX1 PE=4 SV=1	3	1	2.95	319205.15	304469.64	654048.46	654048.46	2.05	InVitro	12.76	1.42	14.02	0.39	0.04
F6XAY6_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q9EQUS SET_MOUSE Protein SET OS=Mus musculus GN=Set PE=1 SV=1 Uncharacterized protein (Fragment) OS=Equis caballus GN=SET PE=3 SV=1 [F6XAY6_HORSE_K9K207_HORSE]	5	5	4.98	5977840.21	2163055.10	12195083.65	12195083.65	2.04	InVitro	16.24	0.39	16.86	0.57	0.03
F6RF51_HORSE	homolog (eV: 0.0) sp Q17QG2 NUDC_BOVIN Nuclear migration protein nudo OS=Bos taurus... Uncharacterized protein OS=Equis caballus GN=NUDC PE=4 SV=1	9	9	8.91	626831.96	266825.52	1268521.69	1268521.69	2.02	InVitro	13.97	0.41	14.68	0.41	0.01

10. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere:

Frau Dr. Jasmin Walter für die vertrauensvolle Überlassung des Themas, und die professionelle wissenschaftliche Begleitung der gesamten Dissertation. Ohne ihre fröhliche und unermüdliche Unterstützung wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Bleul für die Übernahme des Referats

Herrn Prof. Dr. Hanspeter Nägeli für die Übernahme des Korreferats

Dr. Bernd Roschitzki, Claudia Fortes und Dr. Jonas Grossmann vom Functional Genomic Center Zürich und ETH Zürich für die Durchführung der Proteomikanalysen und wissenschaftliche Begleitung.

Frau Benita Pineroli aus der Abteilung Züchtungsbiologie für die Herstellung der Medien.

Frau Dr. Aldona Pieńkowska-Schelling für die Färbemethoden.

Meiner Dissertationskollegin med.vet. C. Monthoux für die Zusammenarbeit im Labor und die Organisation von Stuten.

Allen Pferdeschlachthöfen für die Überlassung der Ovarien.

Herrn Paul Müller für die Betreuung der Stuten am Tierspital.

Allen Stutenbesitzern für die vertrauensvolle Überlassung der Stuten.

Frau Dr. Verena Bracher für die flexible Arbeitseinteilung in der Tierklinik Leimental während den praktischen Versuchen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern Marie-Therese und Josef sowie meinen Geschwistern Sibylle und Michael, und meiner Freundin Chantal für die motivierende und aufmunternde Unterstützung während der gesamten Arbeit herzlich danken. Sie haben sich um mein Wohl gesorgt und mich während der arbeitsintensiven Phase durch alle Hochs und Tiefs getragen.

11. LEBENSLAUF

Fabian Huwiler

Geboren am 06.10.1986 in Cham

Heimatort: Cham, Dietwil

1993-1999	Primarschule in Cham
1999-2005	Kantonsschule in Zug
Juni 2005	Matura Schwerpunktfach Wirtschaft und Recht in Zug
2006-2013	Studium der Veterinärmedizin an der Universität Zürich
November 2013	Eidg. Staatsexamen als Tierarzt
August 2014-Oktober 2018	Doktorat an der Klinik für Reproduktionsmedizin am Departement für Nutztiere der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich, unter der Leitung von Prof. Dr. Ulrich Bleul, Direktor: Prof. Dr. Heiner Bollwein
Februar 2013-Dezember 2016	Assistentztierarzt an der Tierklinik Leimental, Biel-Benken
seit Januar 2016	Selbständiger Tierarzt, Tierarztpraxis Huwiler, Cham

